

Otimização do processo de produção de lípidos e carotenóides a partir da biomassa da levedura *Rhodotorula glutinis* NRRL Y-1091

Teresa Margarida Parreira Januário

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Alimentar

Orientador: Doutora Maria Teresa Saraiva Lopes da Silva

Coorientador: Professora Maria Luísa Lopes de Castro e Brito

Júri:

Presidente: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar com Agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogais: -Doutor José Carlos Pereira Roseiro, Investigador Principal do Laboratório Nacional de Energia e Geologia, I.P.

-Doutora Maria Teresa Saraiva Lopes da Silva, Investigadora Auxiliar do Laboratório Nacional de Energia e Geologia, I.P.

Agradecimentos

À Doutora Teresa Lopes da Silva por todas as oportunidades, pela orientação, por todo o conhecimento transmitido, por toda a ajuda e disponibilidade

À Professora Luísa Brito por toda a ajuda, orientação, disponibilidade e sensibilidade.

À Cláudia Freitas por todo o ensinamento, pela paciência, cumplicidade, por toda a ajuda e pela amizade.

Ao Doutor José Roseiro por toda a ajuda no planeamento experimental, por todos os conselhos e disponibilidade.

À D. Céu Penedo e à Dra. Margarida Monteiro pela paciência e ajuda.

À Dra. Carla Santos, ao Eng^o Carlos Barata e à Mariana Araújo, pela ajuda, pela companhia e boa disposição.

Ao LNEG- Laboratório Nacional de Energia e Geologia, mais particularmente à Unidade de Bioenergia, por disponibilizar todos os meios existentes nos laboratórios para a realização do presente trabalho.

Resumo

Neste trabalho utilizou-se a levedura *Rhodotorula glutinis* NRRL Y-1091, com capacidade de produção de lípidos e carotenóides, com interesse comercial, tendo em vista a co-produção de lípidos (para biodiesel) e carotenóides, a partir da sua biomassa.

Concluiu-se que, das fontes de carbono simples estudadas (glicerol, frutose, glucose e sacarose), a sacarose proporcionou maior produção de biomassa ($4,10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) e menor percentagem de células com membrana permeabilizada (0,7 %), refletindo-se numa maior produtividade de ácidos gordos ($0,03 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) e carotenóides ($2,27 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$).

De entre os substratos complexos de baixo custo estudados (xarope de polpa de alfarroba e melaço de cana de açúcar), o que proporcionou melhores resultados foi o xarope de polpa de alfarroba, com maior produtividade em biomassa ($0,11 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$), ácidos gordos ($0,02 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$), carotenóides ($9,79 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) e maior percentagem de células viáveis (84,9 %).

O planeamento experimental, segundo a distribuição de Doehlert, permitiu concluir que as condições que proporcionam máxima produção de lípidos ($0,03 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) e carotenóides ($5,00 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$), a partir do xarope de polpa de alfarroba, correspondem a um volume de cultura de 120 mL e uma concentração de açúcares totais de $106,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, sendo a maior produtividade em biomassa ($0,18 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) obtida numa igual concentração de açúcares totais mas num volume de cultura de 380 mL.

Palavras-chave: *Rhodotorula glutinis*, carotenóides, ácidos gordos, xarope de polpa de alfarroba, citometria de fluxo.

Abstract

In this work, the oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* NRRL Y-1091, with capacity of producing lipids and carotenoids of commercial interest, was used in order to co-produce lipids (for biodiesel) and carotenoids from the yeast biomass.

Several low-cost carbon sources were used in the yeast medium culture. It was concluded that, among the studied individual carbon sources (glycerol, fructose, glucose and sucrose), sucrose induced the highest biomass concentration ($4.10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) and the lowest percentage of cells with permeabilized membranes (0.7%), which was reflected in a higher productivity in fatty acids ($0.03 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) and carotenoids ($2.27 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$).

Among the low-cost complex substrates studied (carob syrup and molasses), carob pulp syrup produced the highest biomass productivity ($0.11 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) and the higher percentage of viable cells (84.9%), giving the highest fatty acid and carotenoid productivities, $0.02 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ and $9.79 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, respectively.

The Doehlert experimental design allowed to conclude that the conditions that provided the highest lipid productivity ($0.031 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) and carotenoid ($5.00 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$), from carob pulp syrup, is the volume of 120 mL and a total sugar concentration of $106.3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, with the highest biomass productivity of $0.18 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, obtained at an equal concentration of total sugars, but at a lower availability of oxygen (380 mL).

Keywords: *Rhodotorula glutinis*, carotenoids, fatty acids, carob pulp syrup, flow cytometry.

It has been reported that the world fossil oil reserves will be exhausted in less than 100 years. Therefore, it is urgent to find substitutes that meet the current world energy demand.

Biofuels produced from plants have the potential to replace a portion of fossil fuel consumption. However, there is a growing concern about the use of food crops for biodiesel and other renewable fuels, as an uneconomical long term solution.

Microbial oils are believed to be promising potential feedstock for biodiesel production, because their fatty acid composition are similar to those of vegetable oils. Compared with vegetable oils, the production of microbial oil has many advantages: short life cycle, less labor required and they are not affected by season and climate.

Some yeasts like *Rhodotorula glutinis* are oleaginous and able to produce carotenoids which are of great commercial interest. The co-production of these intracellular compounds together with lipids from the yeast biomass may contribute significantly to reduce the biodiesel production costs.

To obtain a more sustainable biodiesel production, it is also important to use low cost substrates, such as industrial by-products. In the present work, different low cost individual substrates were used as carbon sources (glycerol, sugarcane molasses and carob pulp syrup) to produce lipids and carotenoids by the yeast *R. glutinis* NRRL Y-1091, and a comparison was made.

Flow cytometry (FC) was used to monitor carotenoid content and cell viability (membrane potential and membrane integrity) during all the yeast cultivations. In a first stage, data revealed that the carbon source that induced more lipids, carotenoids and biomass concentration was sucrose, followed by glucose, fructose and glycerol.

Based in these results, two agro-industrial byproducts containing sucrose, glucose and fructose were used as carbon source in the yeast medium: carob pulp syrup and sugarcane molasses.

Between these two carbon sources, the highest biomass concentration was obtained for the yeast medium containing carob pulp syrup with a total sugars concentration of $75 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. It was observed in this culture a higher proportion of cells with intact and polarized membranes (84.9%) and highest productivity of fatty acids ($0.02 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) and carotenoids ($9.79 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$).

It is known that the pigment produced in highest amounts by the yeast *Rhodotorula* species is β -carotene, followed by torulene and torularodina. However when growing on carob pulp syrup and sugarcane molasses with a total sugars concentration of $75 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ and $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, the yeast *R. glutinis* produced torulene in

highest amount. The highest amount of torulene was obtained when growing on carob pulp syrup with a total sugars concentration of $75 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($50.16 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}_{\text{biomassa}}^{-1}$).

The monounsaturated fatty acid proportion obtained when the yeast was grown on carob syrup was highest (49.70% m/m) than when grown on molasses (43.06% m/m), indicating that the lipid composition obtained in the former case is more suitable for biodiesel purposes.

To determine which total sugar concentration and medium volume (oxygen availability) provided growth with increased production of lipids and carotenoids by *Rhodotorula glutinis*, a Doehlert experimental design was used. It was concluded that the conditions that provided greater lipid ($0.031 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) and carotenoids ($5.00 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$), from carob pulp syrup, was a volume of 120 mL and a total sugar concentration of $106.3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, with the highest biomass productivity ($0.18 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) obtained at an equal concentration of total sugars but a medium with lower availability of oxygen (380 mL).

The results of this study suggest that the carob pulp syrup is a promising carbon source for the production of lipids, for biodiesel, and carotenoids to use as additives in the food industry.

Índice

Agradecimentos	I
Resumo	II
Abstract	III
Extended Abstract	IV
Índice	VI
Lista de abreviaturas e símbolos	VIII
Índice de Figuras	IX
Índice de Equações	XI
Índice de Tabelas	XII
1. Introdução	1
1.1 Biodiesel como biocombustível	2
1.2 Matérias-primas	4
1.3 <i>Rhodotorula glutinis</i>	6
1.4 Carotenóides	6
1.5 Citometria de fluxo multiparamétrica	7
1.6 Planeamento Experimental	10
2. Objetivos	11
3. Materiais e Métodos	11

3.1 Reagentes	11
3.2 Microrganismo e condições de cultivo	11
3.3 Métodos Analíticos	13
3.4 Parâmetros cinéticos	18
3.5 Citometria de Fluxo multiparamétrica	20
3.6 Planeamento Experimental	21
4. Resultados e Discussão	22
4.1 Resultados preliminares	22
4.2 Seleção da fonte de carbono	26
4.3 Melaço de cana <i>versus</i> Xarope de alfarroba	32
4.4 Resultados do Planeamento Experimental	41
5. Conclusão	54
6. Bibliografia	55
Anexo I. Reagentes	666
Anexo II. Correlação entre a absorvância e a massa seca da biomassa	688

Lista de abreviaturas e símbolos

A-	Absorvância
AGT-	Ácidos gordos totais
AT-	Açúcares totais
ATP-	Adenosina trifosfato
CT-	Carotenóides Totais
DiOC ₆ (3)-	Iodeto de 3,3'-dihexiloxacarbocianina
DMSO-	Dimetilsulfóxido
FL-	Detetor de fluorescência do citómetro de fluxo
FS-	<i>Forward angle light scatter</i>
GC-	Cromatografia Gasosa
HCl-	Ácido clorídrico
HPLC-	Cromatografia líquida de alta performance
IP-	Iodeto de propídio
MCA-	Melaço de cana de açúcar
MCA75-	Melaço de cana de açúcar com concentração de açúcares totais de 75 g·L ⁻¹
MCA100-	Melaço de cana de açúcar com concentração de açúcares totais de 100 g·L ⁻¹
MM-	Massa molecular
NaOH-	Hidróxido de sódio
PBS -	<i>Phosphate buffer solution</i>
rpm-	Rotações por minuto
SCO-	<i>Single cell oil</i>
UE-	União Europeia
X-	Biomassa
XPA-	Xarope de polpa de alfarroba
XPA75-	Xarope de polpa de alfarroba com concentração de açúcares totais de 75 g·L ⁻¹
XPA100-	Xarope de polpa de alfarroba com concentração de açúcares totais de 100 g·L ⁻¹

Figura 1- Consumo de petróleo no mundo, nos países da OCDE, Médio Oriente, Ásia Não-OCDE e outros não-OCDE, entre 1990 e 2035 em milhões de barris por dia	1
Figura 2- Reação de transesterificação para produção de biodiesel	3
Figura 3- Produção de biodiesel de 2005 a 2010	3
Figura 4- Configuração de um citómetro de fluxo	7
Figura 5- Sinais FSC e SSC obtidos no crescimento da levedura <i>R. glutinis</i> em a) XPA75, b) XPA100 e c) MCA75 d) MCA100	20
Figura 6- Células de <i>R. glutinis</i> após 48 h de crescimento: a) coradas com DiOC ₆ (3), b) tratadas com CCCF e coradas com DiOC ₆ (3)	23
Figura 7- Gráfico de densidade de células de <i>R. glutinis</i> . a) após 48h de crescimento coradas com DiOC ₆ (3) e IP b) células em meio com privação de nutrientes, coradas com DiOC ₆ (3) e IP.	24
Figura 8- Teor de CT ($\mu\text{g g}^{-1}$) e percentagem de AGT (m/m) produzidos pela levedura <i>R. glutinis</i> durante o crescimento em diferentes fontes de carbono simples	27
Figura 9- Gráficos de densidade de células de <i>Rhodotorula glutinis</i> coradas com IP e DiOC ₆ (3), crescidas em diferentes fontes de carbono a) frutose b) sacarose c) glucose d) glicerol	30
Figura 10- Teor de CT ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) e percentagem de AGT produzidos pela levedura <i>Rhodotorula glutinis</i> no crescimento em XPA75, XPA100, MCA75 e MCA100 ..	32
Figura 11- Gráficos de densidade de células de <i>Rhodotorula glutinis</i> coradas com IP e DiOC ₆ (3), ensaio em a) XPA75, b) XPA100 c) MCA75 d) MCA100	37
Figura 12- Superfícies de resposta correspondentes à a) biomassa produzida, b) açúcar consumido e c) azoto consumido	48

Figura 13- Superfícies de resposta correspondentes a a) células polarizadas, b) células despolarizadas e c) células permeabilizadas.....	49
Figura 14- Superfície de resposta CT, produzidos pela levedura <i>R. glutinis</i>	50
Figura 15- Superfície de resposta dos AGT, produzidos pela levedura <i>R. glutinis</i>	51

Índice de Equações

Equação 1- Quantificação dos ácidos gordos	15
Equação 2- Quantificação do teor em azoto, expresso em percentagem.....	17
Equação 3- Taxa volumétrica de consumo da fonte de carbono.	17
Equação 4- Taxa volumétrica de consumo da fonte de azoto.	17
Equação 5- Rendimento em biomassa em função da fonte de carbono.....	18
Equação 6- Rendimento em ácidos gordos totais em relação à fonte de carbono.. ...	18
Equação 7- Rendimento em carotenóides totais em relação à fonte de carbono).	18
Equação 8- Produtividade da biomassa.....	18
Equação 9- Produtividade de ácidos gordos totais.....	19
Equação 10- Produtividade de carotenóides totais.	19
Equação 11- Modelo associado ao planeamento <i>Doehlert</i> , onde Y é a resposta de cada teste; β corresponde aos parametros do modelo polinomial; X é o nível do fator.	22
Equação 12	22
Equação 13	22
Equação 14	22

Tabela 1- Composição do meio de cultura semi-definido (valores em $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	13
Tabela 2- Diferentes condições de crescimento (volume e concentração do meio) para otimização da produção de lípidos e carotenóides pela <i>R. glutinis</i> .	22
Tabela 3- Parâmetros relativos ao crescimento da levedura <i>R. glutinis</i> em várias fontes de carbono simples ($35 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$).	28
Tabela 4- Percentagem de ácidos gordos (m/m), produzidos pela levedura <i>R. glutinis</i> em fermentações com diferentes fontes de carbono: glucose, frutose, glicerol e sacarose.	30
Tabela 5- Parâmetros relativos à produção de biomassa, consumo de carbono, produtividade e rendimento em AGT e CT, em ensaio de fermentação em XPA75, XPA100, MCA75 e MCA100.	34
Tabela 6- Composição em ácidos gordos dos lípidos produzidos pela levedura <i>R. glutinis</i> quando crescida em MCA e XPA nas concentrações de AT de 75 e $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.	37
Tabela 7- Teor de β -caroteno, toruleno e torularodina da levedura <i>R. glutinis</i> NRRL Y-1091 desenvolvida em XPA75, XPA100, MCA75 e MCA100.	39
Tabela 8- Concentração de biomassa (X) ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), AGT (% m/m) e CT ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), percentagem de células polarizadas, despolarizadas e permeabilizadas e consumo de AT ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e azoto ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) da levedura <i>R. glutinis</i> em crescimentos sob diferentes condições de concentração de AT e transferência de oxigénio.	43
Tabela 9- Parâmetros do modelo polinomial representativos das respostas estudadas. β_0 , resposta no centro do domínio experimental; β_1 e β_2 , parâmetros dos fatores 1 e 2 respetivamente; β_{12} , parâmetro da interação dos fatores 1 e 2.	47
Tabela 10- Produtividade de biomassa (P_X) ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$), CT (P_{CT}) ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) e AGT (P_{AGT}) ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	52

Tabela 11- Valores críticos calculados em ambos os testes F.	53
Tabela 12- Reagentes químicos utilizados ao longo do trabalho laboratorial.	66

Este trabalho foi financiado por Fundos FEDER através do Programa Operacional Factores de Competitividade- COMPETE e por Fundos Nacionais através da FCT- Fundação para a Ciência e a Tecnologia, âmbito do projeto CAROFUEL PTDC/AAC-AMB/116534/2010 “NOVO PROCESSO DE PRODUÇÃO SUSTENTÁVEL DE BIODIESEL: A BIOREFINARIA DA LEVEDURA RHODOTORULA GLUTINIS COMO FONTE DE BIODIESEL, BIOGÁS E CAROTENÓIDES”.

1. Introdução

Os combustíveis fósseis são a força motriz da atual economia mundial. O consumo mundial de energia, na sua maioria proveniente de reservas fósseis, bem como as previsões para os próximos 20 anos, tem vindo a crescer (Figura 1) devido ao aumento da população mundial e ao crescimento industrial que se observa em diversos países (Talebnia, Karakashev, & Angelidaki, 2010). Por esta razão assiste-se, em simultâneo, ao esgotamento das reservas petrolíferas mundiais, ao aumento da dependência energética de muitos países e ao aumento dos níveis de CO₂ e outros gases, resultantes da utilização desses combustíveis (Freitas C. , 2011).

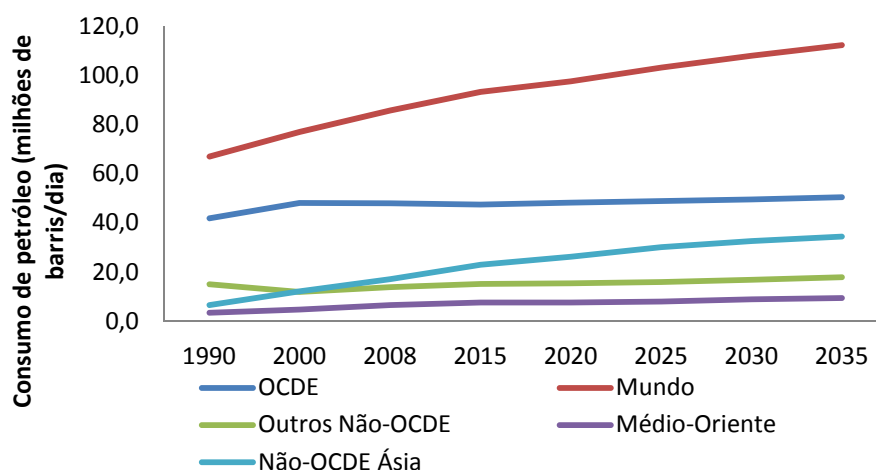


Figura 1-Consumo e previsões de consumo de petróleo no mundo, nos países da OCDE, Médio Oriente, Ásia Não-OCDE e outros não-OCDE, entre 1990 e 2035 em milhões de barris por dia (adaptado de EIA, 2011) (EIA, Energy Information Administration. International Energy Statistics.).

O setor dos transportes possui a maior parcela de consumo de energia fóssil, seguido-se o setor industrial, residencial e comercial (EIA, Energy Information Administration. International Energy Statistics.). A importância e a dimensão do setor dos transportes obrigaram a que fossem criadas medidas para diminuir os impactos ambientais associados ao uso de energia de origem fóssil nesse setor, na Europa. Nesse sentido, em 2009, visando promover a utilização de energia proveniente de fontes renováveis, implementou-se a diretiva 2009/28/EC, que estabelece como objetivos nacionais obrigatórios uma quota de 20% de energia proveniente de fontes renováveis no consumo anual bruto de energia, e uma quota de 10% de energia proveniente de fontes renováveis no setor dos transportes, a atingir até 2020 (EIA, Energy Information Administration. International Energy Statistics.).

Atualmente, os recursos fósseis não são considerados sustentáveis do ponto de vista económico, ambiental e social (Naik, Goud, Rout, & Dalai, 2010). A nível social, a qualidade de vida é geralmente proporcional ao consumo de energia *per capita*, sendo este um indicador do nível de desenvolvimento de determinado país ou região (Pasten & Santamarina, 2012). A utilização dos recursos fósseis causa desigualdades sociais porque não estão acessíveis a todas as regiões do mundo, na medida em que, aproximadamente 6% da população mundial consome menos do que 0,1 kW/pessoa/ano. Nestes países, as taxas de analfabetismo, mortalidade infantil e fertilidade são altas, enquanto que a esperança média de vida é baixa. Quarenta e quatro por cento da população consome menos de 1kW/pessoa/ano (considerado o nível de energia necessária para ter uma qualidade de vida adequada à tecnologia atual). Por outro lado, 15% da população consome mais de 5 kW/pessoa/ano (energia que proporciona elevada qualidade de vida com a tecnologia existente) (Pasten & Santamarina, 2012). Neste contexto, é espetável que aumente a procura por recursos energéticos, pelo que é necessário e urgente procurar fontes de energia alternativas (Omer, 2008).

Os biocombustíveis produzidos a partir de fontes renováveis podem ajudar a minimizar a queima de combustíveis fósseis, bem como a produção de CO₂. Atualmente a produção de biocombustíveis é relativamente reduzida, mas encontra-se em expansão (Ajanovic, 2011).

A primeira geração de biocombustíveis levanta preocupações relacionadas com as fontes de matéria-prima (milho, trigo, cana-de-açúcar, soja, colza), pelo impacto que a sua utilização para biocombustíveis poderá ter na preservação da biodiversidade e pela sua competição com culturas alimentares, o que poderá levar ao aumento do preço dos alimentos (Naik, Goud, Rout, & Dalai, 2010). Dependendo de fatores climáticos, a preferência por cada uma das matérias-primas difere entre regiões (Ajanovic, 2011).

A segunda geração de biocombustíveis (derivada de material lenhocelulósico de resíduos de agricultura, florestas e de matérias-primas não-alimentares) e a terceira geração (derivada de microrganismos e microalgas) são consideradas fontes alternativas viáveis (Lopes da Silva, Roseiro, & Reis, 2012).

A produção de biocombustíveis microbianos apresenta algumas vantagens relativamente às culturas agrícolas, nomeadamente ciclos de vida mais curtos e baixa manutenção, não sendo a produção afetada por estações do ano ou clima (Lopes da Silva, Feijão, Roseiro, & Reis, 2011).

Contudo, atualmente o preço de produção destes biocombustíveis é ainda superior ao dos combustíveis fósseis, não sendo, por isso, economicamente

sustentável. Desta forma, as tecnologias envolvidas no processo de produção dos biocombustíveis microbianos necessitam de ser otimizadas (Lopes da Silva, Roseiro, & Reis, 2012).

1.1 Biodiesel como biocombustível

O biodiesel é um recurso renovável, biodegradável, não-tóxico e essencialmente neutro em dióxido de carbono quando produzido de forma sustentável. Contudo, o biodiesel derivado de fontes atuais (culturas oleaginosas, óleos de fritura e gorduras animais) não consegue satisfazer a atual procura por combustíveis para transportes (Lopes da Silva, Feijão, Roseiro, & Reis, 2011). A sua produção industrial consiste no processo de transesterificação dos triacilglicerois presentes em gorduras, com um álcool de cadeia curta, geralmente metanol (devido ao seu menor custo), do qual resultam ésteres metílicos de ácidos gordos e glicerol (Figura 2).

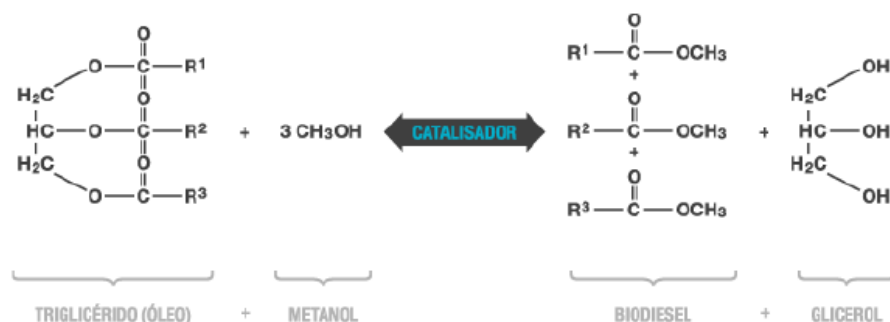


Figura 2- Reação de transesterificação para produção de biodiesel. Os radicais R¹, R² e R³ representam cadeias de ácidos gordos (Naik, Goud, Rout, & Dalai, 2010).

A reação decorre numa sequência de três passos: os triglicéridos são convertidos em diglicéridos, em seguida os diglicéridos convertidos em monoglicéridos e estes convertidos em ésteres e glicerol (Andrade R. , 2010). Os ésteres metílicos de ácidos gordos (biodiesel) são utilizados como biocombustível (Almeida & Quirino, 2012).

A produção de biodiesel aumentou consideravelmente nos últimos anos, sendo a Europa o maior produtor de biodiesel, produzindo aproximadamente 10 Milhões de m³ em 2010, seguida da América do Sul e Central (Figura 3).

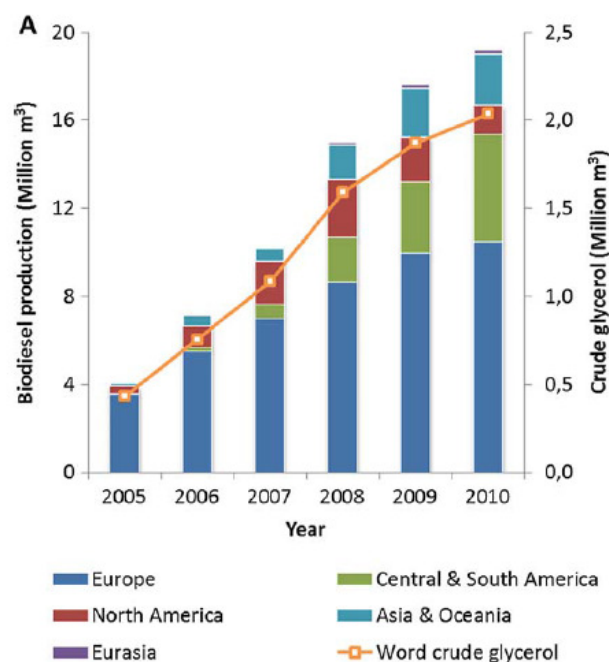


Figura 3- Produção de biodiesel de 2005 a 2010 (Almeida & Quirino, 2012).

Atualmente, 70% a 90% da produção da indústria do biodiesel baseia-se em óleos vegetais, com todas as desvantagens referidas anteriormente (Naik, Goud, Rout, & Dalai, 2010).

Os microrganismos são considerados uma fonte de óleo alternativa aos óleos vegetais e animais (Meng, Yang, Xu, Zhang, Nie, & Xian, 2009).

A grande maioria dos estudos que visa a produção de biodiesel a partir de óleos microbianos, utilizam microalgas autotróficas (Zeng, Danquah, Chen, & Lu, 2011) (Chisti, 2007). Contudo, é difícil obter elevadas produtividades de biomassa e de óleo, devido à limitação da luz e acumulação do oxigênio nas culturas fotoautotróficas, pelo que estas apresentam taxas de crescimento e produtividades em biomassa e óleos menores, quando comparadas com as das bactérias ou dos fungos filamentosos (Lopes da Silva, Feijão, & Reis, 2010).

A produção de biodiesel a partir de leveduras, pode trazer mais vantagens como maiores taxas de crescimento e produtividades em lípidos. A sua capacidade de crescer em meios de fermentação de baixo custo, como resíduos alimentares provenientes da agricultura e da indústria (Saenge, Cheirsilp, Suksaroge, & Bourtoom, 2011), pode diminuir os custos de produção da biomassa e do óleo (Lopes da Silva, Feijão, Roseiro, & Reis, 2011).

1.2 Matérias-primas

No processo químico de transesterificação, usado para produção de biodiesel, o glicerol é obtido como subproduto da reação, sendo o seu valor comercial de baixo custo. Algumas estirpes da espécie *Rhodotorula*, produtoras de carotenóides e lípidos conseguem crescer em glicerol (Cutzu, et al., 2012) (Saenge, Cheirsilp, Suksaroge, & Bourtoom, 2011).

A sacarose, estando presente em muitos subprodutos da indústria alimentar, poderá ser utilizada na composição de meios de crescimento, como fonte de carbono, tal como a glucose e a frutose que resultam da sua hidrólise, sendo bem conhecido que a glucose é uma fonte de carbono rapidamente metabolizável por muitos microrganismos (Aksu & Eren, 2007). A utilização da sacarose como substrato, pela levedura *R. glutinis* é possível porque esta possui invertases que quebram a ligação glicosídica entre as moléculas de glucose e frutose que constituem a molécula de sacarose (El-Banna, El-Razek, & El-Mahdy, 2012) (Rubio, Runco, & Navarro, 2002).

Os elevados custos de produção de biodiesel a partir de microrganismos são o maior obstáculo à sua comercialização (Karatay & Dönmez, 2010). Estes podem ser reduzidos com a co-produção de produtos de alto valor acrescentado no mesmo processo. Outra forma de reduzir esses custos consiste na utilização de substratos de baixo custo, como o melaço de cana e o xarope de alfarroba, subprodutos de processos agro-industriais, como componentes do meio de cultura dos microrganismos.

O melaço de cana é um subproduto da indústria do açúcar e contém, em média, 50% (m/m) de açúcares totais (AT). Geralmente, o melaço contém principalmente sacarose, glucose e frutose (Aksu & Eren, 2007) (Takeshige & Ouchi, 1995) e, por isso, é considerado uma matéria-prima ideal para formulações de meios de cultura baratos (Huang, Chen, Xiong, Chen, & Ma, 2013), tendo sido amplamente utilizado para a produção de etanol (Alegre, Rigo, & Joeke, 2003) (Takeshige & Ouchi, 1995). O melaço de cana já foi utilizado na produção de *Single cell oil* (SCO- termo atribuído a qualquer microrganismo que acumule mais de 20% da sua massa em óleo na forma de triacilglicerois), sendo um componente que, apesar do elevado conteúdo em açúcares, favorece o crescimento de microrganismos oleaginosos (Huang, Chen, Xiong, Chen, & Ma, 2013).

A alfarrobeira (*Ceratonia siliqua*) foi introduzida na península ibérica pela civilização árabe e, desde aí, cresce no sul de Portugal (Roseiro J. C., 1991) e ao longo da bacia mediterrânica (Roseiro, Duarte, Oliveira, & Gírio, 2013). É uma planta

capaz de crescer e dar frutos em climas muito secos e tem contribuído, desde há séculos, para a economia dos países mediterrânicos.

Atualmente, as sementes da alfarroba, que correspondem a 10% do peso seco do fruto, têm aplicação na indústria no fabrico da goma de alfarroba e como aditivo alimentar (E410) (Roseiro, Duarte, Oliveira, & Gírio, 2013), devido à sua biocompatibilidade.

Um terço da polpa de alfarroba (corresponde a 90% da massa seca do fruto (El Batal, Hasib, Ouatmane, Dehbi, Jaouad, & Boulli, 2011)) é utilizado na alimentação de animais, em produtos regionais e como substituto do cacau (Roseiro, Duarte, Oliveira, & Gírio, 2013). Contudo, o baixo conteúdo em proteínas e a presença de polifenóis, limitam a sua utilização em alimentos (Roseiro J. C., 1991). A variedade da alfarroba, origem geográfica, condições climáticas, colheita e armazenagem, e também fatores tecnológicos como os métodos de extração influenciam o tipo de compostos fenólicos presentes na alfarroba (Roseiro, Duarte, Oliveira, & Gírio, 2013). Contém elevados níveis de açúcares (sacarose, glucose e frutose) (Roseiro J. C., 1991) (El Batal, Hasib, Ouatmane, Dehbi, Jaouad, & Boulli, 2011), que são facilmente extraídos (Roseiro J. C., 1991). Dos açúcares presentes, a sacarose encontra-se entre 65-75% do total de açúcares, seguida da glucose e da frutose que representam entre 15-25% do total de açúcares, sendo ainda possível encontrar em baixas concentrações outros açúcares como a maltose e a xilose, entre outros (Petit & Pinilla, 1995). Devido ao elevado teor em açúcares e ao facto de ser um subproduto da indústria alimentar, é uma promissora matéria-prima para a produção de biocombustíveis (Sánchez, Lozano, Godínez, Juan, Pérez, & Hernández, 2010). Grande parte dos estudos publicados sobre a utilização do xarope da polpa de alfarroba referem a produção de bioetanol (Turhan, Bialka, Demirci, & Karhan, 2010) (Ercan, Irfan, & Mustafa, 2013) (Sánchez, Lozano, Godínez, Juan, Pérez, & Hernández, 2010).

Portugal é presentemente o terceiro maior produtor mundial de alfarroba, com uma produção de 22 452 toneladas em 2010 (Roseiro, Duarte, Oliveira, & Gírio, 2013).

1.3 *Rhodotorula glutinis*

A levedura da espécie *Rhodotorula glutinis* classifica-se taxonomicamente no super-reino *Eukaria*, reino *Fungi*, Sub-reino *Dikaria*, Filo *Basidiomycota*, Sub-filo *Puciniomycotina*, classe dos *Microbotriomycetes*, ordem *Sporidiobolales*, género *Rhodotorula* (Banno, 1967) e espécie *Rhodotorula glutinis*.

Em determinadas condições de crescimento, esta levedura pode acumular cerca de 60% de lípidos em relação à sua massa seca, tornando-a numa SCO.

As colónias são alaranjadas devido à presença de carotenóides, sendo os mais usuais o β -caroteno, toruleno e torularodina, variando as suas concentrações com as condições de cultivo (Andrade R. , 2010).

Esta levedura tem sido referida como um dos microrganismos potencialmente produtores de óleo para obtenção de biodiesel (Dai, Tao, Xie, Dai, & Zhao, 2007) (Easterling, French, Hernandez, & Licha, 2009) (Yen & Zhang, 2011) e também de carotenóides, com interesse na indústria alimentar e farmacêutica (Aksu & Eren, 2007) (El-Banna, El-Razek, & El-Mahdy, 2012) (Yen & Zhang, 2011) (Marova, Certik, & Breierova, 2011) (Xu, Zhao, Wang, Du, & Liu, 2012).

1.4 Carotenóides

Carotenóides são pigmentos naturais lipossolúveis (El-Banna, El-Razek, & El-Mahdy, 2012), responsáveis pelas cores amarelo, laranja, vermelho e roxo encontrados em vários microrganismos e plantas (Andrade R. , 2010). A estrutura de um carotenóide consiste basicamente num esqueleto de quarenta átomos de carbono. As suas cores são determinadas principalmente por uma cadeia de ligações duplas carbono-carbono na molécula (Andrade R. , 2010).

Existem vários estudos que demonstram que os carotenóides combatem vários tipos de cancro e outras doenças porque são antioxidantes e fonte de pro-vitamina A (Aksu & Eren, 2007). São considerados produtos de alto valor acrescentado, utilizados na indústria alimentar e farmacêutica, podendo atingir no mercado algumas centenas de dólares por miligrama.

Uma forma de produção de carotenóides é a via sintética. Através de uma sequência de reações químicas, obtem-se o carotenóide em questão a partir de um substrato de estrutura semelhante a do produto final. A desvantagem deste processo reside no facto de poder acumular resíduos ou impurezas químicas no produto final (Andrade R. , 2010) tornando este impróprio para consumo alimentar. Uma outra forma de se produzir estes compostos, é pela via microbiana, utilizando bactérias, algas, fungos filamentosos e leveduras. A produção de carotenóides microbianos é altamente eficiente pela facilidade de manipulação dos sistemas de processamento, e não apresenta as desvantagens da síntese química.

1.5 Citometria de fluxo multiparamétrica

1.5.1 Equipamento

A citometria de fluxo consiste num sistema de deteção de células e de várias funções celulares (Lopes da Silva, Roseiro, & Reis, 2012). Permite caracterizar uma

população de células analisando uma única célula de cada vez, quando estas intersejam um feixe de radiação. A intensidade dos sinais óticos gerados pela radiação emitida é correlacionada com parâmetros estruturais ou funcionais das células (Freitas C. , 2011).

O citómetro de fluxo é composto por uma fonte de radiação (laser ou lâmpada de mercúrio), uma câmara de fluxo, fotodíodos ou fotomultiplicadores, para a detecção dos sinais de interesse e uma unidade de processamento de dados (Figura 4).

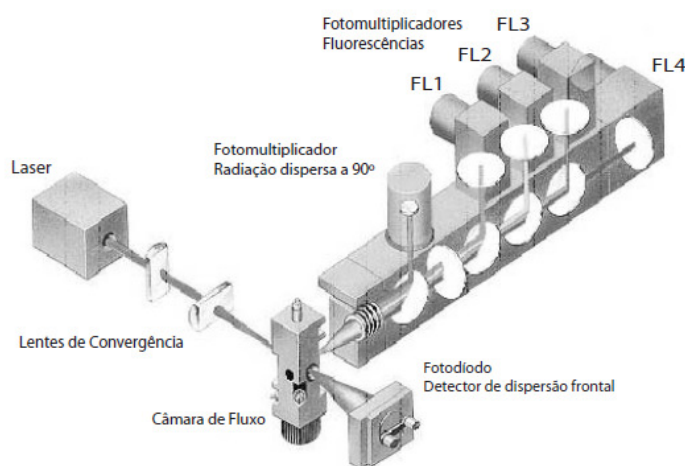


Figura 4-Configuração de um citómetro de fluxo (Lopes da Silva, Reis, Hewitt, & Roseiro, 2004)

A amostra a analisar, consiste numa suspensão de células ou partículas em solução tampão salina, é injectada e atravessa a câmara de fluxo, onde as células passam, uma a uma, perpendicularmente ao feixe de radiação, e em regime laminar. A velocidade de escoamento do fluido de revestimento (solução tampão) é superior à da amostra, de forma a que passe uma célula de cada vez. Assim podem ser detetadas até 100000 células, em poucos minutos.

Sempre que o feixe de radiação interseja uma célula na câmara de fluxo, sofre dispersão frontal (*forward scatter* ou FS) e dispersão lateral (*side scatter* ou SS). A radiação FS é detetada diretamente por um fotodíodo e dá-nos informação sobre a dimensão da célula. A radiação SS é desviada a 90° por espelhos dicróicos, lente e filtros ópticos, sendo detectada por um fotomultiplicador, e é proporcional à complexidade interna da célula (Figura 4).

A fluorescência intrínseca de alguns compostos celulares ou resultante da adição de corantes fluorescentes (fluorocromos) é detetada por fotomultiplicadores (Figura 4) (Lopes da Silva, Reis, Hewitt, & Roseiro, 2004). Os detetores convertem a radiação medida em sinais eletrónicos, que são convertidos em sinais digitais e que vão sendo acumulados em tempo real sob a forma de gráficos de vários tipos (de

densidade, de pontos, contorno, histogramas) que podem ser visualizados em computador (Freitas C. , 2011).

1.5.2 Aplicações da citometria de fluxo

Até recentemente, a monitorização do crescimento microbiano (quer à escala de bancada, quer à escala comercial) tem sido realizada através de análises microbiológicas tradicionais, tais como a massa seca ou o método de diluições seriadas, das quais só se obtêm os resultados algum tempo após a amostragem, muitas vezes depois do bioprocessamento ter terminado. Este desfasamento entre o tempo da colheita e a obtenção dos resultados, impede que se utilizem esses dados durante a evolução do bioprocessamento para optimização do mesmo. Outros métodos como a absorvância, apesar de serem mais rápidos, apenas fornecem dados sobre a presença das células microbianas, não dando qualquer informação sobre o estado fisiológico das células (Lopes da Silva, Feijão, & Reis, 2010).

Acresce que, no decurso de qualquer processo microbiano, é essencial monitorizar a viabilidade das células, para além da deteção do crescimento celular. De facto, a proporção de células mortas ou lesadas que não participa no processo de biotransformação é responsável pela diminuição do rendimento do mesmo. Assim, é essencial conhecer a proporção de células inativas, de forma a ajustar as condições de cultivo (por exemplo, alterando as taxas de agitação, arejamento, ou alimentação, no caso das fermentações em regimes semi-descontínuos), a fim de eliminar ou reduzir essa população de células.

A utilização da citometria de fluxo multiparamétrica na monitorização e optimização de processos microbiológicos é de grande interesse, pois permite analisar, de forma rápida, e em tempo real, o estado fisiológico das células, permitindo alterar a estratégia de controlo do bioprocessamento, de modo a aumentar a sua eficiência. Por esta razão, a técnica tem também particular interesse em estudos de aumento de escala (Lopes da Silva, Reis, Hewitt, & Roseiro, 2004).

A utilização de fluorocromos em associação com a citometria de fluxo pode dar-nos informação adicional sobre a estrutura ou funcionalidade da célula. Por exemplo, alguns fluorocromos ligam-se especificamente a moléculas celulares (ácidos nucleicos, lípidos, proteínas), aumentando a sua fluorescência. Outros acumulam-se em determinados compartimentos celulares ou alteram as suas propriedades através de reações bioquímicas específicas em resposta a alterações no ambiente celular (pH, polarização da membrana ou atividade enzimática). Assim, é possível separar as células em subpopulações, dadas as suas diferentes funcionalidades, permitindo

identificar estados fisiológicos intermédios entre a plena atividade metabólica e a morte celular (Freitas C. , 2011).

1.5.2.1 Integridade da membrana

As células microbianas são delimitadas por uma membrana citoplasmática que lhes permite comunicar seletivamente com o ambiente que as rodeia, através dos sistemas de transporte ativo e passivo, o que gera um gradiente eletroquímico. Para uma célula se manter metabolicamente ativa, é obrigatória a existência de sistemas de transporte ativo e passivo e de uma membrana citoplasmática polarizada (Lopes da Silva, Reis, Kent, Kosseva, Roseiro, & Hewitt, 2005).

O corante iodeto de propídio (IP) liga-se às cadeias de DNA, em células cuja membrana está permeabilizada (Lopes da Silva, Reis, Hewitt, & Roseiro, 2004). Desta forma, dá-nos informação sobre a integridade da membrana (Lopes da Silva, Roseiro, & Reis, 2012). O IP em associação com a citometria de fluxo permite a quantificação da proporção de células com membrana permeabilizada numa população microbiana (Andrade R. , 2010).

1.5.2.2 Potencial de membrana

O potencial de membrana é gerado pela diferença de concentrações de iões no interior e no exterior da membrana citoplasmática, estando intimamente relacionado com a síntese de ATP na célula (Lopes da Silva, Reis, Hewitt, & Roseiro, 2004). O corante *3,3-dihexylocarbocyanine iodide* (DiOC₆(3)) permite detetar variações do potencial da membrana citoplasmática e mitocondrial (Sabnis, Deligeorgiev, Jachk, & Dalvi, 1998). Este fluorocromo, carregado positivamente, acumula-se no interior das membranas mitocondrial e citoplasmática quando estão polarizadas, pois o interior está carregado negativamente (Díaz, Herrero, García, & Quirós, 2010).

A combinação de vários fluorocromos em citometria de fluxo permite a diferenciação de diferentes subpopulações numa determinada população, correspondentes a diferentes níveis de funcionalidade de células (Lopes da Silva, Reis, Hewitt, & Roseiro, 2004). Neste trabalho, o IP e o DiOC₆(3) foram utilizados em conjunto, de forma a caracterizar-se o estado da membrana citoplasmática e mitocondrial da levedura.

1.6 Planeamento Experimental

A complexidade de sistemas em que diferentes fatores variam em simultâneo não é expressa nas abordagens científicas clássicas em que se varia um fator de cada vez.

Planeamentos experimentais que utilizam distribuições experimentais num domínio em que diferentes fatores variam em simultâneo e cujos resultados, quando representados por modelos lineares de ajuste, dão uma visão interativa e alargada da variação dos fatores, para além do peso relativo dos fatores.

Se se pretender averiguar quais os factores mais influentes numa determinada resposta, aplicam-se distribuições de primeira ordem, como a distribuição de Plackett-Burman (Ferreira, Santos, Quintella, Neto, & Bosque-Sendra, 2004). No presente trabalho, pretendeu-se otimizar um processo, logo utilizaram-se distribuições de segunda ordem como a distribuição de Doehlert que, segundo Ferreira *et al.* (2004) é a mais eficiente e a que necessita de menor número de experiências.

O planeamento experimental *Doehlert* permite organizar as experiências de forma a que o máximo de informação seja obtida a partir dos dados.

O domínio experimental é a zona de valores dos fatores a estudar, varia entre limites que determinam a sensibilidade do estudo. Os fatores que influenciaram a experiência neste trabalho foram a concentração de AT e a transferência de oxigénio. Os níveis dos fatores são especificados de acordo com conhecimento pré-existente sobre o sistema ou, devido a restrições físicas.

Os dados são organizados em matrizes para resolução de modelos lineares com equações simultâneas. Esta distribuição é utilizada para traçar as superfícies de resposta da região experimental, por meio de linhas de isoresposta. Este gráfico é muito útil para localizar quais as condições de interesse para o sistema. As superfícies de resposta são também importantes, para entender os mecanismos dos fatores em estudo (Roseiro J. C., 1991).

O planeamento de *Doehlert* aplicado a duas variáveis, consiste num ponto central e seis pontos formando um hexágono. O número de níveis varia em função do número de variáveis a serem estudadas. De acordo com a distribuição de *Doehlert*, uma variável irá ser estudada a cinco níveis e a outra apenas a três.

A análise dos resultados experimentais inclui uma avaliação da adequação deste modelo, para expressar os fenómenos através do ajuste dos dados experimentais e, uma avaliação da variação devido a erros experimentais (Roseiro J. C., 1991).

2. Objetivos

Este trabalho teve como principal objetivo otimizar as condições de cultivo da levedura oleaginosa *Rhodotorula glutinis* NRRL Y-1091 de modo obter-se a máxima produtividade em lípidos e carotenóides.

Estudaram-se várias fontes de carbono no meio de cultura da levedura *Rhodotorula glutinis*. Todas as culturas foram monitorizadas em termos de biomassa, carbono e azoto residual, teor de ácidos gordos, teor de carotenóides e viabilidade celular (avaliada em termos de integridade da membrana citoplasmática e do potencial da membrana citoplasmática e mitocondrial).

3. Materiais e Métodos

3.1 Reagentes

Os reagentes utilizados neste trabalho estão descritos no Anexo I (Tabela 12)

3.2 Microrganismo e condições de cultivo

3.2.1 Microrganismo

Utilizou-se a levedura oleaginosa *Rhodotorula glutinis* NRRL Y-1091, adquirida à *National Collection of Yeast Cultures* (Norwich, UK). A levedura foi mantida em rampas de *Malt Extract Agar*, previamente esterilizado a 121 °C durante 20 min (Uniclave 88, Portugal) sendo incubadas (Incubator SANYO, E.U.A) a 30 °C, durante 72 h.

3.2.2 Pré-inóculo

Os crescimentos foram realizados em frascos *Erlenmeyer* de 1L com anteparas (de modo a garantir uma eficiente transferência de oxigénio). Os *Erlenmeyers* foram inoculados transferindo células de duas rampas de *Malt Extract Agar* para os 200 mL de meio fresco. De seguida, foram incubados a 30 °C, 150 rpm (Unitrom Infors, Suíça), na ausência de luz, durante 24 h (cultura em fase exponencial).

A solução de glucose foi esterilizada à parte e adicionada ao meio esterilizado.

Os frascos *Erlenmeyer* foram posteriormente inoculados com 2,5% v/v desta cultura de *Rhodotorula glutinis*.

O meio utilizado foi o descrito por Yoon and Rhee, (1983) com adaptações:

Tabela 1. Composição do meio de cultura semi-definido (valores em g·L⁻¹)

Meio	CaCl ₂ ·2H ₂ O	MgSO ₄ ·7H ₂ O	Na ₂ HSO ₄	KH ₂ PO ₄	Extrato de Levedura	Ureia	Glucose
Yoon and Rhee	0,134	0,73	2	7	0,5	0,455	35

3.2.3 Seleção da fonte de carbono

Foram estudadas quatro fontes de carbono: o glicerol, para avaliar a capacidade de degradação de um sub-produto da indústria do biodiesel (Figura 2), a sacarose, a glucose e a frutose, por serem açúcares presentes no melaço de cana de açúcar e no xarope de alfarroba, subprodutos de indústrias alimentares. A concentração da fonte de carbono foi de 35 g·L⁻¹, mantendo-se a restante composição do meio idêntica à descrita na Tabela 1. Os crescimentos foram realizados em duplicado.

Foram colhidas amostras para t=0 h e t=48 h e procedeu-se à leitura do valor de pH (Conсор C3021, Bélgica), e da absorvância a 600 nm (ThermoSpectronic Genesys 20, Portugal). Ao fim de 48 h, as culturas foram centrifugadas (centrífuga Beckman Avanti J-25I, EUA) e o sobrenadante foi recolhido e armazenado para posterior quantificação dos açúcares por HPLC e do azoto total através do método de *Kjeldahl*.

As amostras colhidas às 48 h foram imediatamente analisadas no citómetro de fluxo (FACScalibur, Becton Dickinson Instruments, Bélgica), para deteção do teor de carotenóides, da integridade da membrana citoplasmática e do potencial das membranas citoplasmática e mitocondrial. As culturas foram centrifugadas e o sobrenadante foi recolhido para posterior quantificação dos açúcares e azoto total. A biomassa centrifugada foi liofilizada para posterior quantificação do teor de ácidos gordos.

3.2.4 Melaço de cana versus Xarope de Alfarroba

Após a seleção da melhor fonte de carbono individual para a produção de lípidos e carotenóides pela levedura *Rhodotorula glutinis*, testaram-se o xarope de polpa de alfarroba e o melaço de cana de açúcar, como fontes de carbono no meio de cultura da levedura.

Li *et al.* (2007) e Karatay *et al.* (2010) verificaram que a concentração de biomassa e lípidos produzidos pela levedura *Rhodospiridium toruloides*, aumenta com a concentração de glucose inicial até um máximo de 150 g·L⁻¹, concentração a partir da qual se observa um decréscimo significativo na concentração de biomassa e lípidos

devido à inibição por excesso de substrato. Concluíram que a máxima concentração de biomassa e lípidos produzidos, foram obtidos com 60 a 100 g·L⁻¹ de glucose inicial.

Relativamente à produção de carotenóides, Bhosale e Gadre (2001) observaram que a produtividade máxima de carotenóides foi obtida nos crescimentos da levedura *R. glutinis*, em MCA, com concentração de AT inicial de 60 e 70 g·L⁻¹. Com base nestes resultados, o XPA e o MCA foram adicionados ao meio de cultura da levedura de forma a obterem-se as concentrações de 75 e 100 g·L⁻¹ de AT.

Os açúcares solúveis da polpa de alfarroba foram extraídos por contacto da polpa com a água, na razão de 2 L de água por cada quilograma de material sólido. Após 12 h à temperatura ambiente, a fase líquida foi recolhida e a sólida prensada. O xarope recolhido foi centrifugado a 10000 rpm durante 1 h e posteriormente filtrado com bomba de vacuo *Edwards* (GEC Small Machines LTD, UK). Utilizaram-se filtros de papel com 9 cm (de passagem rápida), 12,5 cm e 11 cm de diâmetro (de passagem lenta) (Rundfilter Macherey-nagel, E.U.A.). Posteriormente, o xarope foi filtrado em membranas (GF/C, Whatman, E.U.A), com poro sucessivamente mais reduzido (0,45 µm e 0,22 µm) de forma a eliminar as partículas em suspensão que, quando presentes, interferem na análise citométrica. O xarope foi autoclavado.

Antes de se proceder à esterilização por filtração, o pH do XPA foi acertado a 5,5 pela adição de NaOH 5M, com elétrodo de pH (Consort C3021, Bélgica).

A concentração de AT no xarope obtida neste procedimento foi de aproximadamente 200 g·L⁻¹.

3.3 Métodos Analíticos

3.3.1 Correlação entre a absorvância e a biomassa

A fim de se estabelecer uma correlação entre a massa seca e a absorvância, foi recolhida a biomassa de uma cultura de *R. glutinis*, desenvolvida no meio descrito na Tabela 1, durante 24 h, a 30 °C e 150 rpm.

A partir da suspensão celular concentrada (5 g·L⁻¹) prepararam-se várias suspensões celulares, em soro fisiológico, com diferentes concentrações (g·L⁻¹) (0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 e 4,0) em balões de 25 mL.

A concentração da biomassa seca foi determinada em duplicado, filtrando 5 mL de cada suspensão celular com filtros de membrana de nitrocelulose, com poro de 0,2 µm (GF/C, Whatman, E.U.A), previamente secos em estufa a 100 °C (Mettler, Alemanha), durante 16 h e pesados a seguir. Após filtração, os filtros foram

novamente secos em estufa a 100 °C e pesados. A massa seca foi obtida por diferença entre o filtro com a biomassa e o filtro, após secagem na estufa.

Foi estabelecida uma regressão linear entre a biomassa seca e a absorvância lida para cada uma das suspensões, que foi utilizada para determinar a concentração de biomassa a partir dos dados de absorvância no ensaio de seleção da fonte de carbono (sacarose, glucose, frutose e glicerol). Esta correlação está apresentada no Anexo II.

3.3.2 Quantificação da biomassa produzida

Nos crescimentos em que se utilizou como fonte de carbono, o MCA ou o XPA, esta regressão não foi aplicada, pois o meio apresentava-se corado, o que interferia na leitura da absorvância. Nestas culturas, a biomassa foi determinada por quantificação da massa seca.

Em minitubos previamente secos em estufa (Mettler, Alemanha) a 100 °C durante 16 h, adicionou-se 1,5 mL da amostra, centrifugou-se (centrífuga Biofuge 15, Portugal) durante 5 min a 13500 rpm, e descartou-se o sobrenadante. Repetiu-se este procedimento. Os minitubos com a biomassa centrifugada foram novamente secos na estufa a 100 °C durante 16 h e pesados.

A biomassa foi determinada no início e no final do ensaio.

3.3.3 Identificação e quantificação dos ácidos gordos por cromatografia gasosa

A cromatografia gas-líquido foi a técnica utilizada para a quantificação e identificação de ácidos gordos nas amostras, sob a forma de ésteres metílicos, componentes do biodiesel. Utilizou-se a técnica descrita por Lepage e Roy (1986) com algumas modificações.

A 0,100 g de biomassa liofilizada foram adicionados 2 mL de mistura de metanol/cloreto de acetilo (95:5 v/v) recém-preparada em banho de gelo, pois trata-se de uma reação exotérmica.

Adicionou-se 0,2 mL de solução de padrão interno - ácido heptadecanóico (17:0) em éter de petróleo (5 mg·mL⁻¹, Nu-Check-Prep, Elysian, EUA). A mistura foi fechada num recipiente sob atmosfera de azoto e ao abrigo da luz, e aquecida a 80 °C durante uma hora. Após arrefecimento, à temperatura ambiente, adicionou-se 1 mL de n-heptano para a extração dos ésteres metílicos e 1 mL de água destilada para facilitar a separação das fases. A fase heptanóica (superior) foi transferida para um filtro de

algodão com um leito de sulfato de sódio anidro e filtrada, sendo recolhida num recipiente em atmosfera de azoto.

As amostras foram analisadas num cromatógrafo Varian 3800 equipado com um detector de ionização de chama (FID). A separação dos compostos foi efectuada numa coluna capilar Supelcowax 10, de 30 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme.

O hélio foi utilizado como gás de arraste a um caudal de 1,3 mL·min⁻¹. A temperatura inicial da coluna foi programada para 200 °C durante 20 min, a uma taxa de aquecimento de 20 °C·min⁻¹ até atingir uma temperatura final de 220 °C. A temperatura do injecto e o detector eram de 250 °C e 280 °C, respetivamente.

Cada amostra foi processada em duplicado e cada duplicado injetado duas vezes. A identificação dos ésteres metílicos foi realizada por comparação dos tempos de retenção dos componentes do padrão 461 (Nu-Chek-Prep, Elysian, MN, USA). A quantificação de cada um dos ácidos gordos foi efetuada de acordo com a equação:

$$m_{AG} = \frac{A_{AG}}{A_{17:0}} \times FR_{AG}$$

Equação 1- Quantificação dos ácidos gordos. m AG = quantidade do ácido gordo; A AG = Área do pico do ácido gordo; A 17:0 = Área do pico correspondente ao padrão interno; FR AG = factor de resposta do ácido gordo (considerou-se 1).

3.3.4 Quantificação de açúcares por HPLC

Os açúcares (sacarose, glucose, frutose, glicerol) presentes no meio de crescimento, no início e no final dos crescimentos, assim como no melaço de cana de açúcar e xarope de alfarroba foram quantificados por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) num cromatógrafo (Merck HITACHI, Alemanha) equipado com detector de índice de refração e com uma coluna Sugarpak. A análise decorreu a 75 °C, a uma pressão de aproximadamente 560 psi e a um fluxo de 0,5 mL·min⁻¹.

Os 4 padrões (1 g·L⁻¹, 5 g·L⁻¹, 10 g·L⁻¹ e 25 g·L⁻¹) foram previamente filtrados com membrana de 0,2 µm de poro (GF/C, Whatman, E.U.A), tal como as amostras previamente diluídas em água milipore filtrada, de modo a obterem-se valores dentro da gama dos padrões utilizados.

3.3.5 Identificação e quantificação dos carotenóides por HPLC

Para a identificação e quantificação de carotenóides por HPLC é necessário proceder-se à sua extração prévia. Para tal colocou-se 0,150 g de biomassa liofilizada

num moinho de bolas, durante 3 min (cada cápsula contém 8 esferas) para a ruptura das células.

Posteriormente, adicionou-se 3 mL de DMSO, agitou-se no vortex e aqueceu-se a 40 °C durante 10 min. Centrifugou-se durante 5 min, a 5 °C a 3500 g, recolheu-se o sobrenadante para um tubo *Schott*, protegido com papel pardo de modo a evitar a luz. Repetiu-se a extração com 2 mL de DMSO as vezes necessárias até a biomassa perder a cor alaranjada, característica dos carotenóides, sendo 1 mL o volume de DMSO na última extração, recolhendo-se sempre os sobrenadantes para o mesmo tubo *Schott*.

Adicionou-se ao sobrenadante recolhido 2 mL de acetona, 2 mL de NaCl (20% m/v) e 2 mL de éter de petróleo. Após a formação de três fases, procedeu-se à filtração, com pipeta *Pasteur* preparada com filtro de algodão e leite de sulfato de sódio anidro, da fase superior. Após a filtração de toda a fase superior adicionou-se mais éter de petróleo de modo a extrair o máximo de carotenóides.

Após a extração, os solventes foram evaporados sob azoto, de forma a reduzir o volume. Adicionou-se 1 mL de acetona, evaporou-se novamente com azoto e ressuspendeu-se em 1 mL de acetona. Por fim, o extrato foi filtrado e guardado em *vials*, sob atmosfera inerte de azoto, a -18 °C.

A identificação e quantificação dos carotenóides extraídos foi feita por HPLC. Foi utilizada cromatografia líquida (Hewlett-Packard HP 1100, Alemanha), com um detetor de UV/V fixado em 450 nm, uma coluna Bondapack C18 de fase reversa, tendo sido utilizada uma fase móvel de metanol (com 0,2% de água): acetonitrilo (75:25). As amostras foram eluídas em 25 min a um caudal de 1mL·min⁻¹. A identificação do β-caroteno foi realizada por comparação dos tempos de retenção deste carotenóide obtido na amostra com o tempo de retenção do padrão (β-caroteno 22040, 97%, Sigma, UK). Soluções padrão de concentração de β-caroteno entre 0,8 e 7,5 µg·mL⁻¹ foram usadas para obter a reta de calibração que foi utilizada para determinar a quantidade total de β-caroteno.

Foi utilizada a correlação entre a autofluorescência das células de *R. glutinis* lidas no citómetro no canal FL3 e a concentração de carotenóides, representada pela equação [carotenóides g·L⁻¹] = 4,363FL3 – 11,454 (coeficiente de correlação de 0,98) em que FL3 representa a autofluorescência das células de *R. glutinis* lida no canal FL3, tal como descrito por Cutzu *et al.*(2012).

3.3.6 Determinação do Azoto Total

O método utilizado para quantificação do azoto total nos sobrenadantes das amostras, foi o método clássico de *Kjeldahl* que determina o azoto ligado à matéria orgânica.

10 g de amostra conhecida é aquecida na presença de ácido sulfúrico (20 mL) concentrado (96 %) e de uma mistura catalisadora (1 g), de modo a converter o azoto da matéria orgânica da amostra em sulfato de amónio. A digestão ocorreu em tubos de digestão, na unidade de aquecimento do aparelho de digestão (Kingdak) durante duas horas e meia.

Depois de completa a digestão, deixou-se arrefecer o conteúdo dos tubos à temperatura ambiente e adicionou-se a cada um 100 mL de água destilada. De seguida, adicionou-se 50 mL de ácido bórico (4%) e duas gotas de indicador à amostra correspondente.

Colocaram-se os tubos, um a um, na unidade de destilação e procedeu-se à sua destilação, introduziu-se a solução de NaOH, que provoca a libertação de amoníaco que é arrastado, sendo depois recolhido na solução de ácido bórico diluído.

Doseou-se o amoníaco por titulação com ácido clorídrico (0,1 N), que na presença do indicador de pH passa de verde a violeta, a pH 4,8.

O teor em azoto total de cada amostra, expresso em percentagem, é calculado através da seguinte formula geral:

$$\% \text{ azoto} = \frac{0,14 \times V}{m}$$

Equação 2- Quantificação do teor em azoto, expresso em percentagem (massa de azoto / 100 mL de amostra). V= volume em cm³ da solução de ácido clorídrico (0,1 N) gasto na titulação da amostra; m= massa expressa em gramas da toma do produto.

3.4 Parâmetros cinéticos

Para caracterização do crescimento e capacidade de produção de lípidos e carotenóides da *R. glutinis* foram calculados vários parâmetros cinéticos.

3.4.1 Taxa volumétrica de consumo da fonte de carbono

A taxa volumétrica de consumo da fonte de carbono foi calculada através da seguinte equação:

$$r_c = \frac{C_i - C_f}{\Delta t}$$

Equação 3- Taxa volumétrica de consumo da fonte de carbono. r_c = taxa volumétrica de consumo da fonte de carbono (g·L⁻¹·h⁻¹), que pode ser r_{glu} (quando a fonte de carbono é glucose), r_{sac} (quando a fonte

de carbono é sacarose), r_{gli} (quando a fonte de carbono é o glicerol) e r_{fru} (quando a fonte de carbono é frutose). C_i = concentração da fonte de carbono para $t=0$ h ($g \cdot L^{-1}$), C_f = concentração da fonte de carbono para $t=48$ h ($g \cdot L^{-1}$) e Δt = intervalo de tempo decorrido (48 h).

3.4.2 Taxa volumétrica de consumo da fonte de azoto

A taxa volumétrica de consumo da fonte de azoto foi calculada através da seguinte equação:

$$r_N = \frac{N_i - N_f}{\Delta t}$$

Equação 4-Taxa volumétrica de consumo da fonte de azoto. Onde r_N = taxa volumétrica de consumo da fonte de azoto ($g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$), N_i = concentração da fonte de azoto para $t=0$ h ($g \cdot L^{-1}$), N_f = concentração de fonte de azoto para $t=48$ h ($g \cdot L^{-1}$) e Δt = intervalo de tempo decorrido (48 h).

3.4.3 Rendimento em biomassa

Sabendo as concentrações da fonte de carbono inicial e final e a concentração de biomassa formada durante o crescimento, o rendimento em biomassa em função da fonte de carbono ($Y_{X/C}$) calculou-se através da seguinte equação:

$$Y_{X/C} = \frac{X_f - X_i}{C_i - C_f}$$

Equação 5- Rendimento em biomassa em função da fonte de carbono. Em que $Y_{X/C}$ é o rendimento em biomassa em relação à fonte de carbono ($g_{biomassa} \cdot g_{subs. consumido}^{-1}$), X_i = concentração de biomassa em $t=0$ h ($g \cdot L^{-1}$), X_f = concentração de biomassa em $t=48$ h ($g \cdot L^{-1}$), C_i = concentração de fonte de carbono para $t=0$ h ($g \cdot L^{-1}$) e C_f = concentração de fonte de carbono para $t=48$ h ($g \cdot L^{-1}$).

3.4.4 Rendimento em ácidos gordos totais

O rendimento em ácidos gordos totais em relação à fonte de carbono ($Y_{AG/C}$) foi determinado através da equação:

$$Y_{AGT/C} = \frac{C_{AGTf} - C_{AGTi}}{C_i - C_f}$$

Equação 6- Rendimento em ácidos gordos totais em relação à fonte de carbono. $Y_{AGT/C}$ = rendimento em ácidos gordos totais ($g_{AGT} \cdot g_{subs. consumido}^{-1}$), C_{AGTi} = concentração de ácidos gordos totais em $t=0$ h ($g \cdot L^{-1}$), C_{AGTf} = concentração de ácidos gordos totais em $t=48$ h, C_i = concentração de fonte de carbono para $t=0$ h ($g \cdot L^{-1}$) e C_f = concentração de fonte de carbono para $t=48$ h ($g \cdot L^{-1}$).

3.4.5 Rendimento em carotenóides totais

O rendimento em carotenóides totais em relação à fonte de carbono ($Y_{CT/C}$) calculou-se através da seguinte equação:

$$Y_{CT/C} = \frac{C_{CTf} - C_{CTi}}{C_i - C_f}$$

Equação 7- Rendimento em carotenóides totais em relação à fonte de carbono ($\mu g_{CT} \cdot g_{subs. consumido}^{-1}$). C_{CTf} = concentração de carotenóides totais em $t=48$ h ($\mu g \cdot L^{-1}$), C_{CTi} = concentração de carotenóides totais em $t=0$ h ($\mu g \cdot L^{-1}$), C_i = concentração de fonte de carbono para $t=0$ h ($g \cdot L^{-1}$) e C_f = concentração de fonte de carbono para $t=48$ h ($g \cdot L^{-1}$).

3.4.6 Produtividade da biomassa

A produtividade da biomassa calculou-se através da seguinte equação:

$$P_X = \frac{X_f - X_i}{\Delta_t}$$

Equação 8- Produtividade da biomassa. P_X = produtividade da biomassa ($\text{g}_{\text{biomassa}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), X_i = concentração biomassa em $t=0$ h, X_f = concentração biomassa em $t=48$ h ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), Δ_t = intervalo de tempo decorrido (48 h).

3.4.7 Produtividade de ácidos gordos totais

A produtividade de ácidos gordos totais calculou-se através da seguinte equação:

$$P_{AGT} = \frac{C_{AGf} - C_{AGi}}{\Delta_t}$$

Equação 9- Produtividade de ácidos gordos totais. Onde P_{AGT} = produtividade de ácidos gordos totais ($\text{g}_{AGT} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), C_{AGTi} = concentração de ácidos gordos totais para $t=0$ h, C_{AGTf} = concentração de ácidos gordos totais para $t=48$ h ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) e Δ_t = intervalo de tempo decorrido (48 h).

3.4.8 Produtividade de carotenóides totais

A produtividade de carotenóides totais calculou-se através da seguinte equação:

$$P_{CT} = \frac{C_{CTf} - C_{CTi}}{\Delta_t}$$

Equação 10- Produtividade de carotenóides totais. Onde P_{CT} = produtividade de carotenóides totais ($\mu\text{g}_{CT} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), C_{CTi} = concentração de carotenóides totais para $t=0$ h, C_{CTf} = concentração de carotenóides totais para $t=48$ h ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) e Δ_t = intervalo de tempo decorrido (48 h).

3.5 Citometria de Fluxo multiparamétrica

Utilizou-se um citómetro de fluxo (FACScalibur, Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) equipado com laser de argon de 488 nm e com fotomultiplicadores FL1 (530 \pm 30 nm), FL2 (585 \pm 42 nm), FL3 (>670 nm) e FL4 (600 \pm 16 nm), para monitorizar a integridade da membrana citoplasmática, o potencial das membranas citoplasmática e mitocondrial e quantificar o teor de CT ao longo dos ensaios.

3.5.1 Deteção da viabilidade celular

A integridade da membrana citoplasmática foi detetada através da fluorescência emitida pelas células coradas com o fluorocromo iodeto de propídio (IP) (Invitrogen, EUA). O potencial das membranas citoplasmática e mitocondrial da levedura foi monitorizado através da fluorescência emitida pelas células coradas com o fluorocromo iodeto de 3,3'-dihexiloxacarbocianina ($\text{DiOC}_6(3)$) (Invitrogen, E.U.A).

A monitorização da integridade da membrana citoplasmática e do potencial das membranas citoplasmática e mitocondrial foi realizada, em simultâneo, recorrendo ao

método da dupla coloração, usando os dois corantes acima referido (Lopes da Silva, Reis, Hewitt, & Roseiro, 2004).

A concentração da solução-mãe de IP foi $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em água milliQ filtrada e a concentração da solução final na suspensão celular foi de $0,5 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A concentração da solução-mãe do corante DiOC₆ (3) foi de $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, em DMSO, e a concentração da solução final foi de $5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$.

O IP é excitado a 536 nm e emite a 623 nm, pelo que a fluorescência das células coradas com este fluorocromo pode ser detectada no canal FL3. O DiOC₆(3) é excitado a 484 nm e a fluorescência das células coradas é medida a 501 nm, podendo ser detectado no canal FL1 (Lopes da Silva, Roseiro, & Reis, 2012).

As amostras colhidas, ao longo dos ensaios, foram diluídas em solução tampão salina (PBS, pH 7,0) (Oxoid, Inglaterra) de forma a obter-se cerca de 800 a 1000 eventos por segundo. De seguida, foram adicionados $0,5 \text{ }\mu\text{l}$ de DiOC₆ (3) a $499 \text{ }\mu\text{l}$ de amostra e, após 5 min de incubação, no escuro, à temperatura ambiente, adicionaram-se $0,5 \text{ }\mu\text{l}$ de IP para $499 \text{ }\mu\text{l}$ de células. Desta forma, foi possível monitorizar variações do potencial das membranas mitocondrial e citoplasmática e a integridade da membrana citoplasmática ao longo dos ensaios.

Antes de cada análise, as amostras foram sonicadas durante 10 s, para remover agregados celulares, de forma a garantir a análise de células individuais.

Todos os tampões foram filtrados por membrana de poro $0,2 \text{ }\mu\text{m}$ (GF/C, Whatman, E.U.A), para remover partículas em suspensão.

Os dados obtidos pela citometria de fluxo multiparamétrica foram analisados no programa *Windows Multiple Document Interface flow cytometry* (WinMDI).

3.6 Planeamento Experimental

Os efeitos da concentração de AT no xarope de alfarroba e da transferência de oxigénio na produção de biomassa, ácidos gordos, carotenóides, integridade da membrana citoplasmática e potencial das membranas citoplasmática e mitocondrial da levedura *R. glutinis* foram estudados de acordo com o planeamento experimental *Doehlert*. Este modelo permite produzir superfícies de resposta, mostrando todo o comportamento do sistema.

Realizaram-se sete testes em duplicado dentro do domínio experimental em frascos contendo volumes entre 120 mL e 380 mL, pois a transferência de oxigénio diminui com o aumento do volume de cultura. A concentração de AT varia entre $35 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $130 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Tabela 2).

Foram realizados controlos para cada par de testes, sob as mesmas condições, mas sem adição de inóculo. As condições de cultivo da levedura estão referidas na Tabela 2.

O modelo linear associado ao planeamento *Doehlert* inclui termos de interação, e representa-se pela seguinte equação:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2$$

Equação- 11 Modelo associado ao planeamento *Doehlert*, onde Y é a resposta de cada teste; β corresponde aos parâmetros do modelo polinomial; X é o nível do fator.

Tabela 2 Diferentes condições de crescimento (volume e concentração do meio) para otimização da produção de lípidos e carotenóides pela *R. glutinis*.

Testes	Unidades de Planeamento		AT (g·L ⁻¹)	Volume Total (mL)	Volume de xarope (mL)	Volume de inóculo (mL)	Volume de solução de sais (mL)
	X ₁	X ₂					
1	0,00	0,00	82,5	250	103,1	6,3	140,6
2	1,00	0,00	130,0	250	162,5	6,3	81,3
3	0,50	0,87	35,0	250	43,8	6,3	200,0
4	-1,00	0,00	106,3	380	202,0	9,5	168,5
5	-0,50	-0,87	58,8	120	35,3	3,0	81,7
6	-0,50	0,87	106,3	120	63,8	3,0	53,2
7	0,50	-0,87	58,8	380	111,7	9,5	258,8

Devido às diferentes unidades dos fatores, é necessário utilizar valores codificados, denominados unidades de planeamento.

Os fatores β representam o peso relativo dos fatores e interação.

O cálculo dos fatores β , baseia-se na resolução de equações lineares simultâneas, com matrizes. Contudo a matriz X não pode ser diretamente multiplicada pela Y.

$$Y_{(7 \times 1)} = X_{(7 \times 6)} \beta \Leftrightarrow \text{Equação 12}$$

$$\Leftrightarrow \beta = \frac{1}{X_{(7 \times 6)}} Y_{(7 \times 1)} \quad \text{Equação 13}$$

Esta expressão é uma operação matricial impossível, pois o número de colunas da matriz $\frac{1}{X}$ é diferente do número de linhas da matriz Y (equação 13).

Como tal, o cálculo dos parâmetros β é efetuado com base numa expressão alternativa, descrita por Draper and Smith (1966):

$$\beta = (X'X)^{-1}X'Y \quad \text{Equação 14}$$

3.6.1 Análise Estatística

A validação estatística do planeamento experimental foi feita através da análise de variância (ANOVA). Por forma a saber se o modelo é representativo dos dados obtidos, realizaram-se dois testes F: um para avaliar se a fonte de variância é devida ao facto do modelo não representar corretamente os dados experimentais, ou seja, analisar a eficácia dos fatores; e outro para detetar se a origem da variância foi devida a um erro experimental (desajuste).

4. Resultados e Discussão

4.1 Resultados preliminares

4.1.1. Controlos prévios dos ensaios da citometria de fluxo

Por forma a demonstrar que é possível utilizar a citometria de fluxo multiparamétrica na monitorização da integridade da membrana citoplasmática e do potencial das membranas mitocondrial e citoplasmática das células de *R. glutinis*, foi necessário estabelecer previamente controlos positivos, utilizando os fluorocromos acima mencionados (IP e DiOC₆(3)).

A figura 5 mostra a coloração das células de *R. glutinis* com DiOC₆(3) após 48 h de crescimento, tratadas com CCCF (Cianina carbonil m-clorofenilhidrazona), um composto que colapsa o potencial da membrana citoplasmática e mitocondrial (Koll, Sidoti, Rincheval, & Lecellier, 2001). Pode observar-se que a fluorescência das células tratadas com CCCF e coradas com DiOC₆(3) diminuiu, quando comparada com a fluorescência das células, não tratadas e coradas com DiOC₆(3). Este resultado demonstra que as alterações da fluorescência emitida pelas células coradas com DiOC₆(3) refletem variações do potencial da membrana mitocondrial e citoplasmática da levedura.

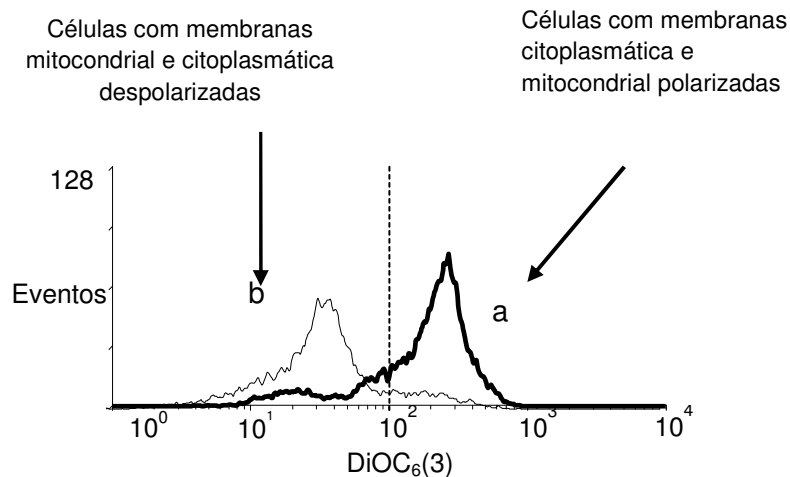


Figura 5- Células de *R. glutinis* após 48 h de crescimento: **a)** coradas com DiOC₆(3), **b)** tratadas com CCCF e coradas com DiOC₆(3)

Na figura 6a pode observar-se o gráfico de densidade correspondente a células que se encontram em fase exponencial (24 h de crescimento), coradas com a mistura IP + DiOC₆(3).

É possível diferenciar três tipos de subpopulações: A) células com membrana citoplasmática intacta e com as membranas mitocondrial e citoplasmática despolarizadas, B) células com membrana citoplasmática intacta e com membranas mitocondrial e citoplasmática polarizadas, e C) células com membrana citoplasmática permeabilizada. Esta diferenciação de subpopulações correspondentes a diferentes estados fisiológicos seria impossível de obter através de técnicas de microbiologia clássica, como a contagem de colónias ou a leitura da absorvância.

Verifica-se que 94% das células encontram-se no quadrante B [cuja população corresponde a células não coradas com IP (IP-), portanto, com membrana citoplasmática intacta, e coradas com DiOC₆(3) (DiOC₆(3)+), com membranas mitocondrial e citoplasmática polarizadas] que representa as células viáveis, como esperado. Apenas 3,2% de células apresentam membrana citoplasmática permeabilizada (Figura 6a - subpopulação C), correspondendo a células coradas com IP (IP +).

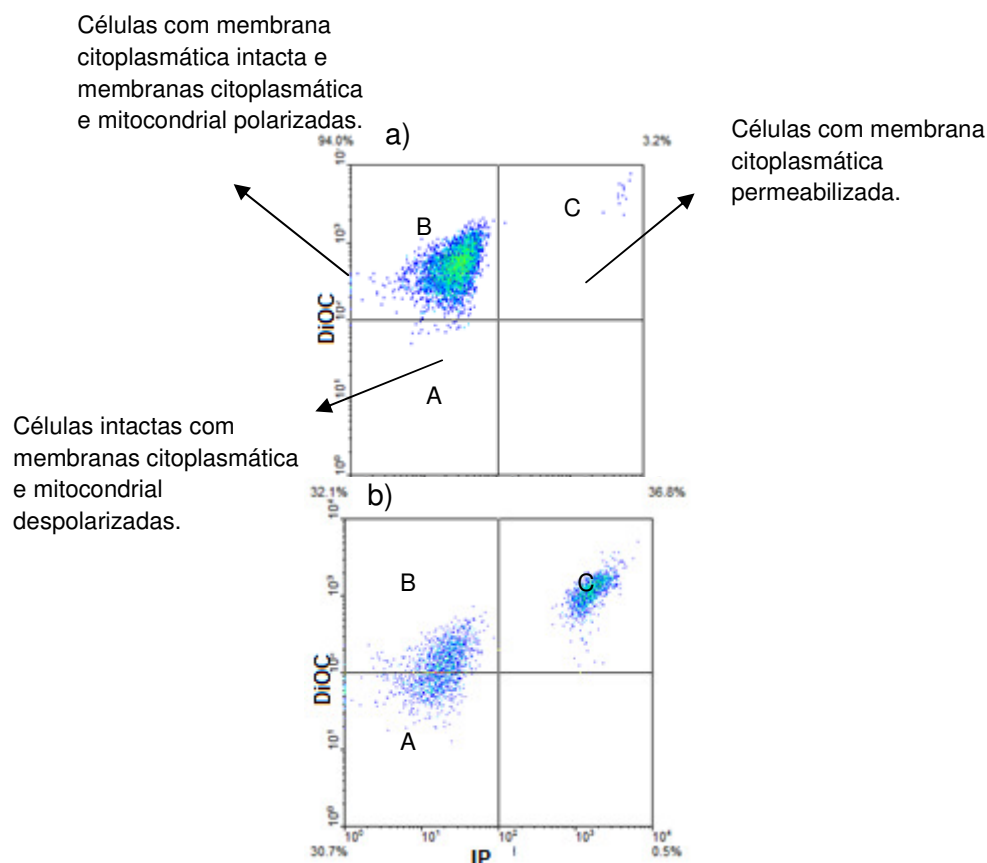


Figura 6-Gráfico de densidade de células de *R. glutinis*. **a)** após 48 h de crescimento coradas com DiOC₆(3) e IP **b)** células em meio com privação de nutrientes, coradas com DiOC₆(3) e IP.

Na figura 6b, observa-se o gráfico de densidade correspondente a células em fase estacionária avançada, sujeitas a privação de nutrientes (após 144 h de crescimento). Pode verificar-se que, comparativamente ao gráfico referente a células em fase exponencial, aumentou a percentagem de células com membrana citoplasmática permeabilizada, (3,2% para 36,8%), bem como a percentagem de células com as membranas despolarizadas (30,7%), em resultado das condições adversas em que as células se encontravam.

Estes ensaios demonstraram que a citometria de fluxo, em associação com os corantes DiOC₆(3) e IP é capaz de diferenciar células de *R. glutinis* com a membrana mitocondrial e citoplasmática polarizada/despolarizada e com a membrana citoplasmática íntegra/permeabilizada.

4.1.2. Detecção de carotenóides totais

O teor de CT foi determinado por medição da autofluorescência das células no detetor FL3, do citómetro de fluxo (detecta comprimentos de onda acima de 670 nm).

Previamente, foram lidas as autofluorescências em FL3 de amostras recolhidas ao longo de uma curva de crescimento de *R. glutinis*. As mesmas amostras foram centrifugadas, e a biomassa foi recolhida para identificação e quantificação dos carotenóides por HPLC. Em seguida, estabeleceu-se uma correlação entre a autofluorescência das células medida no citómetro de fluxo e o teor de CT, quantificado por HPLC, de acordo com o procedimento descrito por Cutzu *et al.*(2012). Desta forma, foi possível utilizar um método de quantificação de carotenóides mais expedito e rápido (cerca de 2 min) do que o método de quantificação tradicional de carotenóides (extração, separação e identificação dos carotenóides por HPLC, cujo tempo de análise é cerca de 10 dias). A correlação estabelecida foi utilizada nestes ensaios.

Por aplicação da correlação entre a autofluorescência das células lida no canal FL3 por citometria de fluxo e a concentração de CT previamente referida, o crescimento em MCA100 apresentava maior concentração de carotenóides, seguido do crescimento em MCA75, XPA100 e por fim XPA75.

Os elevados valores de autofluorescência das células das culturas desenvolvidas em presença de MCA, levantaram a suspeita de que a coloração dos meios contendo MCA pudesse ter interferido na leitura da autofluorescência das células. A fim de se confirmarem esses resultados, procedeu-se à extração e quantificação dos carotenóides por gravimetria e posterior análise por HPLC das amostras de *R. glutinis* colhidas ao fim de 48 h de crescimento em XPA75 e XPA100 e MCA75 e MCA100. Efetivamente, observou-se que, ao contrário dos resultados obtidos por citometria de fluxo, o crescimento da levedura em XPA75 apresentou maior concentração em CT, seguido do XPA100 e por fim o crescimento em MCA75 e MCA100 (Tabela 7). Verificou-se também que o valor obtido através da correlação autofluorescência em FL3 *versus* concentração de CT, foi igual ao obtido por gravimetria e HPLC nas amostras em XPA, mas o mesmo não se verificou no MCA, no qual se obteve teores em CT muito inferiores. Estes resultados sugerem que a cor do MCA poderá ter alterado a leitura da autofluorescência das células lida no citómetro de fluxo. De facto, o citómetro analisa uma única célula de cada vez, e dá-nos informação sobre a sua autofluorescência, mas lê a autofluorescência das partículas coloridas do melão que aderem à membrana das células, resultando valores de autofluorescência muito superiores aos reais.

Na Figura 5 podem observar-se gráficos de densidades (c e d) FS/SS (tamanho/complexidade das células), verifica-se que o MCA, mesmo após filtração com membrana de poro 0,22 µm, produziu mais ruído de fundo do que o XPA. A região R1 delimitada corresponde à população da levedura *R. glutinis*, e todos os restantes

eventos fora desta região correspondem a partículas em suspensão, supostamente provenientes do MCA, podendo haver partículas do MCA no interior da região R1 que podem ter interferido com a análise das células de *R. glutinis*. Também se pode verificar que estas são em maior quantidade, quando se aumenta a concentração de AT no meio, como seria de esperar.

No caso das fontes de carbono individuais, esta situação não aconteceu pois as fontes de carbono simples estudadas (sacarose, glucose, frutose e glicerol) não possuem coloração, não interferindo com a leitura realizada pelo citómetro de fluxo.

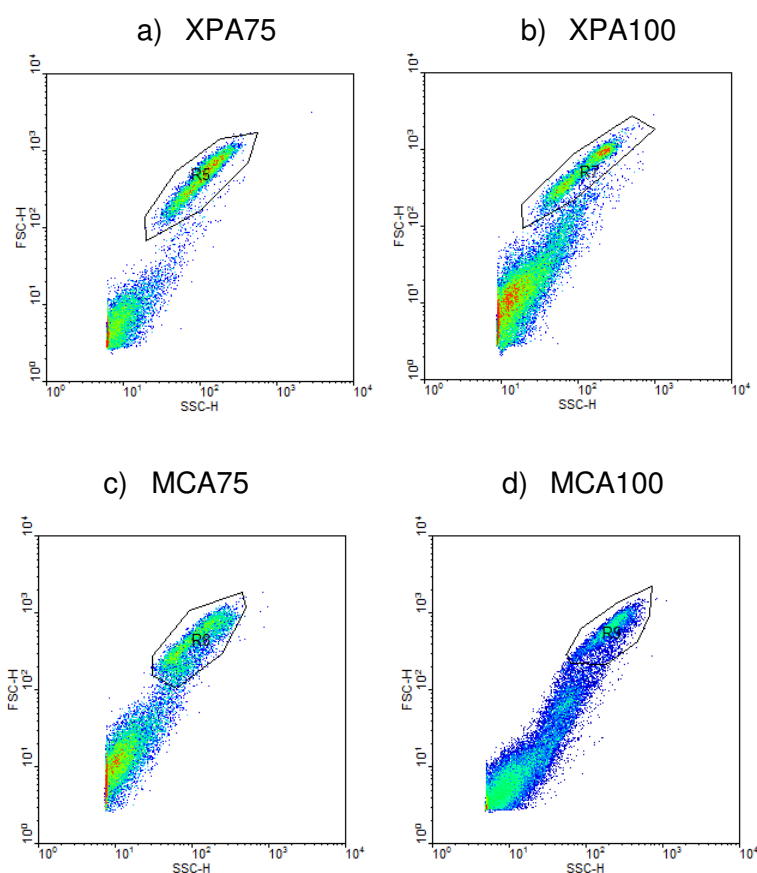


Figura 7- Sinais FSC e SSC obtidos após 48h de crescimento da levedura *R. glutinis* em **a)** XPA75, **b)** XPA100 e **c)** MCA75 **d)** MCA100.

4.2 Seleção da fonte de carbono

4.2.1 Crescimento da levedura

A Tabela 3 apresenta os parâmetros cinéticos obtidos pela levedura *R. glutinis* nos crescimentos em glucose, glicerol, frutose e sacarose.

Tabela 3- Parâmetros relativos ao crescimento da levedura *R. glutinis* em várias fontes de carbono simples (35 g·L⁻¹). [Os valores correspondentes à biomassa foram afetados por um erro experimental que não ultrapassou os 10% (n=2). Os valores correspondentes aos ácidos gordos foram obtidos a partir de dois replicados independentes, injetados em duplicado, com um desvio-padrão que não excedeu os 10% (n=4). Os valores correspondentes à fonte de carbono foram obtidos a partir de amostras injetadas em duplicado, com um desvio-padrão que não excedeu os 10% (n=2)].

Parâmetros	Fontes de Carbono simples			
	Glucose	Glicerol	Frutose	Sacarose
X (g·L⁻¹)	4,10	3,52	3,77	4,73
pH (t= 48 h)	2,85	3,00	2,87	2,86
P_X (g·L⁻¹·h⁻¹)	0,09	0,07	0,08	0,10
r_c (g·L⁻¹·h⁻¹)	0,27	0,12	0,23	0,24
Y_{X/C} (g_X·g_{subs. consumido}⁻¹)	0,32	0,59	0,34	0,42
P_{AGT} (g_{AGT}·L⁻¹·h⁻¹)	0,02	0,01	0,02	0,03
Y_{AGT/C} (g_{AGT}·g_{subs. consumido}⁻¹)	0,08	0,07	0,08	0,11
P_{CT} (μg_{CT}·L⁻¹·h⁻¹)	3,21	1,05	2,79	3,69
Y_{CT/C} (μg_{CT}·g_{subs. consumido}⁻¹)	8,31	3,57	6,70	9,60

A máxima concentração de biomassa produzida (X) pela levedura *Rhodotorula glutinis* (4,73 g·L⁻¹) ocorre no crescimento realizado em sacarose, seguindo-se do crescimento em glucose (4,10 g·L⁻¹), frutose (3,77 g·L⁻¹) e glicerol (3,52 g·L⁻¹). A produtividade em biomassa (P_X) segue a mesma tendência. Esta observação está de acordo com os resultados relatados por Johnson *et al.*(1995), que concluiu que o crescimento da levedura *R. glutinis* IIP-30, em sacarose, atingiu elevadas concentrações de biomassa, comparativamente à glucose, para a mesma concentração de fonte de carbono.

A maior produtividade em biomassa (0,10 g·L⁻¹·h⁻¹), lípidos (0,03 g·L⁻¹·h⁻¹) e carotenóides (3,69 g·L⁻¹·h⁻¹) no crescimento em sacarose pode sugerir que a levedura *R. glutinis* possui maior afinidade para a sacarose do que para as restantes fontes de carbono.

Em todos os casos, o valor de pH final do meio reduziu-se após 48 h de crescimento. O valor de pH mais baixo foi encontrado no crescimento em glucose, sacarose e frutose (2,85, 2,86 e 2,87, respetivamente), em contraste com o valor final do crescimento em glicerol (3,00). Sabe-se que durante o crescimento da levedura há produção de metabolitos ácidos (orgânicos), que são responsáveis pela diminuição do valor de pH do meio de cultivo. A forma não-dissociada dos ácidos orgânicos difunde-se através da membrana citoplasmática e, uma vez no citosol, a sua dissociação está dependente do pH do mesmo, sendo libertados protões. Com o objetivo de manter a

homeostase da célula, são transportados prótons através da membrana para o exterior, pela ATPase invertida da membrana plasmática, gerando um aumento da procura de ATP para expulsar os prótons (Freitas C. , Neves, Reis, Passarinho, & Lopes da Silva, 2012). Este facto explica o maior rendimento em biomassa observado no crescimento em glicerol ($Y_{x/c} = 0,59 \text{ g}_x \cdot \text{g}_{\text{subs. consumido}}^{-1}$) e a menor taxa volumétrica de consumo da fonte de carbono (r_{glicerol}) ter sido verificada no crescimento em glicerol ($0,12 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), como resultado do valor de pH observado ao fim de 48 h para esta cultura.

Efetivamente, Easterling *et al.*(2009) referiram que o glicerol é uma fonte de carbono viável para a produção de lípidos pela levedura *R. toruloides* mas, como complemento de outras fontes de carbono como a glucose, ou seja, por si só o glicerol não é uma fonte de carbono viável para a produção de lípidos e carotenóides.

A percentagem de ácidos gordos totais (AGT) e o teor de carotenóides totais (CT) produzidos pela levedura estão apresentados na Figura 8.

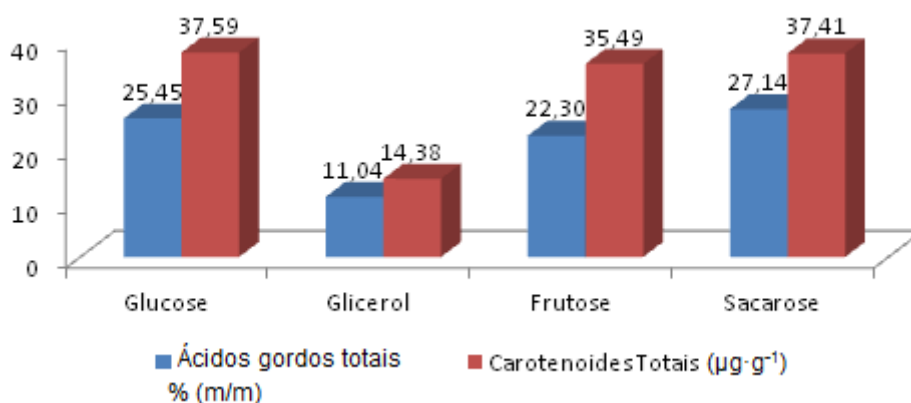


Figura 8- Teor de CT ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) e percentagem de AGT (m/m) produzidos pela levedura *R. glutinis* durante o crescimento em diferentes fontes de carbono simples. [Os valores correspondentes aos ácidos gordos foram obtidos a partir de dois replicados independentes, injetados em duplicado, com um desvio-padrão que não excedeu os 10% (n=4)]

O crescimento em sacarose permitiu uma maior produção de AGT (27,14 % m/m) e CT ($37,41 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) pela levedura *R. glutinis*, seguindo-se o crescimento em glucose (25,45% m/m e $37,59 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, respetivamente), frutose (22,30% m/m e $35,49 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, respetivamente) e glicerol (11,04% m/m e $14,38 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, respetivamente). Também El-Banna *et al.*(2012) obtiveram maior produção de carotenóides quando a levedura *R. glutinis* var. *glutinis* cresceu em sacarose, glucose, xarope de glucose e xarope de milho enriquecido em frutose. Contudo, no crescimento em glicerol a levedura utilizada neste trabalho produziu um teor de carotenóides inferior ao obtido por Saenge *et al.*(2011) que foi de 16,12%.

O glicerol é, das quatro fontes de carbono estudadas, a que tem menor interesse, pois o teor de AGT e CT é aproximadamente 2,6 vezes menor, relativamente aos teores obtidos em sacarose (Figura 8).

Estes resultados são suportados pelos valores apresentados na Tabela 3, na qual se verifica maior produtividade e rendimento em CT ($P_{CT}=3,69 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ e $Y_{CT/C}=9,60 \mu\text{g}_{CT}\cdot\text{g}_{\text{subs. consumido}}^{-1}$, respetivamente) e AGT ($P_{AGT}=0,03 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ e $Y_{AGT/C}=0,11 \text{g}_{AGT}\cdot\text{g}_{\text{subs. consumido}}^{-1}$, respetivamente) no crescimento em sacarose.

4.2.2 Composição em ácidos gordos

Os óleos produzidos por microrganismos têm uma composição em ácidos gordos semelhantes aos óleos vegetais, podendo assim ser utilizados para produzir biodiesel. Contudo, apenas a fração saponificável dos óleos pode ser convertida em biodiesel (Saenge, Cheirsilp, Suksaroge, & Bourtoom, 2011). Para avaliar o potencial da levedura *R. glutinis* como matéria-prima para produção de um substituto do óleo diesel, é importante avaliar a composição de ácidos gordos.

Atualmente, o padrão de qualidade do biodiesel estabelecido na União Europeia para o uso de biodiesel em veículos, está descrito na norma EN 14214/2009 do Comité Europeu de Normalização (Farias, Lemões, Silva, & Silva). Por exemplo, em termos da composição de esteres metílicos do biodiesel, o limite superior do éster metílico do ácido linolénico (18:3) é de 12% (m/m) e o limite superior de ésteres metílicos com quatro ou mais insaturações é de 1% (m/m) (Lôbo, Ferreira, & Cruz, 2009). Sabe-se que a proporção dos ésteres metílicos que compõem o biodiesel influenciam alguns parâmetros de qualidade do mesmo, tais como: índice de saponificação (indica a massa necessária de KOH para saponificar 1g de gordura) e o índice de iodo (quanto mais insaturada é a gordura maior o índice de iodo) (Li, Zhao, & Bai, 2007).

Desta forma, a quantificação dos ácidos gordos que compõem os óleos extraídos dos microrganismos (e de produtos vegetais) é importante para avaliação da qualidade do biodiesel que se pode produzir a partir desses óleos.

Na Tabela 4 observa-se a percentagem de cada um dos ácidos gordos produzidos pela levedura com as diferentes fontes de carbono.

Tabela 4-Percentagem de ácidos gordos (m/m), produzidos pela levedura *R. glutinis* em fermentações com diferentes fontes de carbono: glucose, frutose, glicerol e sacarose. [Os valores correspondentes aos ácidos gordos foram obtidos a partir de dois replicados independentes, injetados em duplicado, com um desvio-padrão que não excedeu os 10% (n=4)].

Ácidos Gordos % (m/m)	Fontes de Carbono			
	Glucose	Frutose	Glicerol	Sacarose
Mirístico 14:0	0,33	0,72	0,97	0,61
Palmítico 16:0	15,90	15,87	22,38	15,55
Palmitoleico 16:1 ω 9	0,18	0,21	0,64	0,19
Esteárico 18:0	22,58	21,89	14,21	18,50
Oleico 18:1 ω 9	37,96	38,07	41,12	40,28
Linoleico 18:2 ω 6	15,88	19,10	18,12	18,29
Linolénico 18:3 ω 3	1,51	-	-	4,11
Araquídico 20:0	3,05	1,56	-	0,28
Behénico 22:0	0,22	0,18	0,16	n.d.
Lignocérico 24:0	2,38	2,39	2,40	2,19
Saturados	44,47	42,62	40,12	37,13
Monoinsaturados	38,13	38,28	41,76	40,47
Polinsaturados	17,39	19,10	18,12	22,40

Observa-se que não há diferenças significativas nas composições dos ácidos gordos, da levedura crescida nas diferentes fontes de carbono.

Em todos os casos, o ácido oleico (18:1 ω 9) é maioritário (37,95% - 41,12% m/m) seguindo-se o esteárico (18:0) (14,21% - 22,58%), o palmítico (16:0) (15,55% - 22,38%) e o linoleico (18:2 ω 6) (15,88% - 19,10%).

A fração de ácidos gordos saturados foi dominante nos crescimentos em glucose e frutose, enquanto que os ácidos gordos monoinsaturados foram dominantes nos crescimentos em glicerol e sacarose. De acordo com Stansell *et al.*(2012), a matéria-prima para a produção de biodiesel deve conter proporções elevadas de ácidos gordos monoinsaturados, pelo que os crescimentos da levedura em sacarose e glicerol resultaram numa composição em ácidos gordos mais adequada para produção de biodiesel, do que os crescimentos em glucose e frutose. Tal como referido por

Easterling *et al.*(2009), confirma-se que a composição em ácidos gordos depende da fonte de carbono.

4.2.3 Citometria de fluxo

A integridade da membrana citoplasmática e a polaridade das membranas citoplasmática e mitocondrial foram analisadas nas células de *R. glutinis* crescidas nas diferentes fontes de carbono.

Na figura 9, podem observar-se os gráficos de densidade correspondentes a células de levedura após 48 h de crescimento, em cada uma das quatro fontes de carbono.

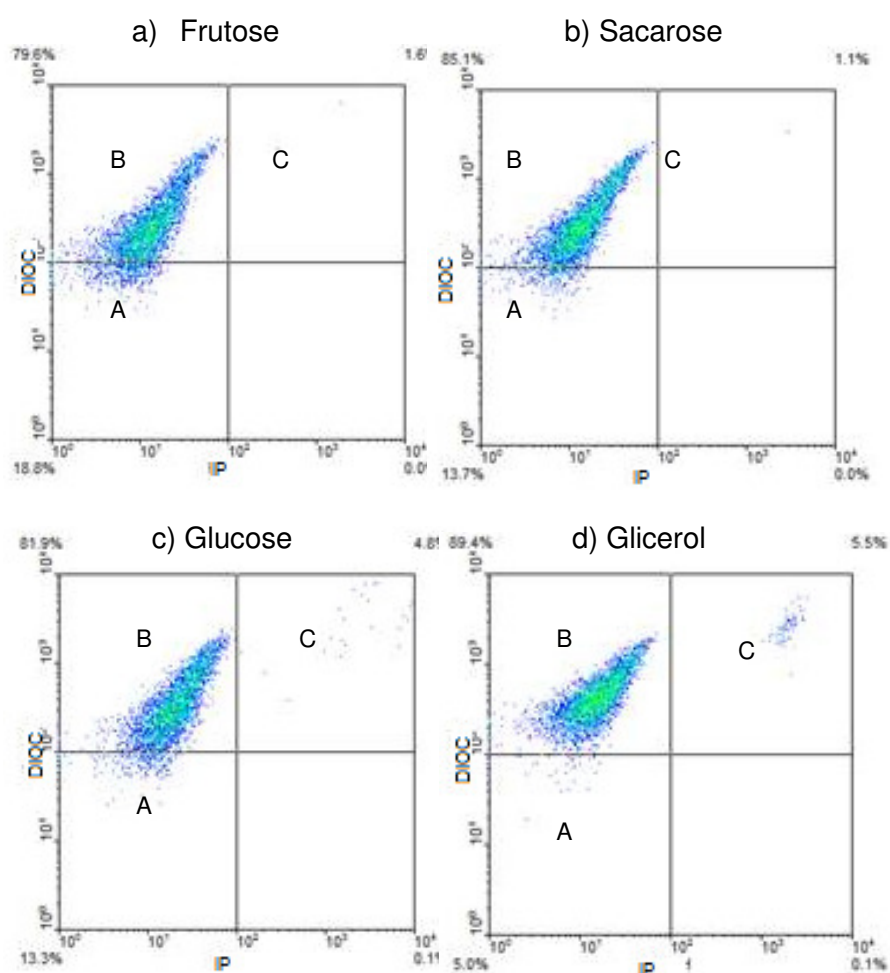


Figura 9- Gráficos de densidade de células de *Rhodotorula glutinis* coradas com IP e DiOC₆(3), crescidas em diferentes fontes de carbono **a)** frutose **b)** sacarose **c)** glucose **d)** glicerol, durante 48h.

A proporção de células com membrana despolarizada (A) foi apenas de 5% no crescimento em glicerol. Contudo, uma proporção mais elevada foi observada nos cultivos em glucose, frutose e sacarose (13,3%, 18,8% e 13,7%, respetivamente).

Este resultado pode ser devido ao facto do valor de pH do meio de cultura, ao fim de 48 h de crescimento ter sido inferior para estas três culturas, como já foi referido. Tem sido relatado que os ácidos fracos, tais como os produzidos durante o metabolismo da levedura, induzem a despolarização da membrana, resultando na dissipação do potencial da membrana citoplasmática, devido ao afluxo da forma não dissociada que perturba o gradiente de prótons através da membrana citoplasmática (Freitas C. , Neves, Reis, Passarinho, & Lopes da Silva, 2012). O efeito da acidez do meio, pode também explicar a maior proporção de células despolarizadas.

Em todas as culturas, a proporção de células com membranas permeabilizadas foi baixa, não superior a 6%.

4.3 Melaço de cana *versus* Xarope de alfarroba

4.3.1 Crescimento da levedura

Os óleos microbianos têm de competir economicamente com as matérias-primas do diesel e do biodiesel, o petróleo e os óleos vegetais, que são atualmente mais baratos. O principal custo do cultivo microbiano (até 80%) deve-se à fonte de carbono utilizada (Schneider, et al., 2013). O processo de produção de biodiesel microbiano pode tornar-se ambiental e economicamente mais favorável com o uso de resíduos agro-industriais como matéria-prima (Lopes da Silva, Feijão, & Reis, 2010).

A capacidade da levedura *R. glutinis* crescer numa grande variedade de fontes de carbono, concede-lhe uma grande vantagem (Aksu & Eren, 2007). Assim, materiais de baixo custo que contêm vários açúcares poderiam ser utilizados para a produção de óleo microbiano (Huang, Chen, Xiong, Chen, & Ma, 2013).

Uma vez que os crescimentos em sacarose, glucose e frutose induziram maior produção de ácidos gordos e carotenóides, o melaço de cana de açúcar (MCA) e o xarope de polpa de alfarroba (XPA) foram utilizados como fontes de carbono que foram adicionadas ao meio de cultura da levedura, com concentrações finais de AT de 75 e 100 g·L⁻¹.

Na tabela 5 é possível observar-se que o valor de pH obtido no final do crescimento (t=48 h) não atingiu valores tão baixo como os obtidos nas culturas com as fontes de carbono simples (sacarose, glucose, frutose, glicerol), o que sugere que o XPA e o MCA adicionados ao meio têm um efeito tampão, provavelmente devido à sua elevada concentração de sais. Este efeito tampão terá protegido as células do efeito de toxicidade ácida observado nos crescimento com fontes de carbono individuais, como resultado da diminuição do valor de pH final do meio.

Tabela 5- Parâmetros relativos à produção de biomassa, consumo de carbono, produtividade e rendimento em AGT e CT, em ensaio de fermentação em XPA75, XPA100, MCA75 e MCA100. [Os valores de biomassa foram obtidos a partir de dois replicados independentes com um desvio-padrão que não ultrapassou 10% (n=2). Os valores correspondentes à fonte de carbono foram obtidos a partir de amostras injetadas em duplicado, com um desvio-padrão que não excedeu os 10% (n=2). Os valores de AGT foram obtidos a partir de dois replicados independentes injetados em duplicado, com um desvio-padrão que não excedeu os 10% (n=4). Os valores de CT foram obtidos a partir da injeção de 2 replicados, com um desvio-padrão que não excedeu os 10 % (n=2).]

Parâmetros	Fonte de Carbono			
	XPA75	XPA100	MCA75	MCA100
X (g·L⁻¹)	5,28	4,50	5,35	3,97
pH (t=48 h)	4,47	4,56	5,69	5,75
P_X (g·L⁻¹·h⁻¹)	0,11	0,09	0,11	0,08
r_c (g·L⁻¹·h⁻¹)	0,07	0,40	0,81	1,30
Y_{X/C} (g_X·g_{subs. consumido}⁻¹)	1,58	0,23	0,14	0,06
P_{AGT} (g_{AGT}·L⁻¹·h⁻¹)	0,02	0,01	0,01	0,01
Y_{AGT/C} (g_{AGT}·g_{subs. consumido}⁻¹)	0,27	0,03	0,02	0,01
P_{CT} (μg_{CT}·L⁻¹·h⁻¹)	9,79	8,55	3,85	1,60
Y_{CT/C} (μg_{CT}·g_{subs. consumido}⁻¹)	140,28	21,23	4,74	1,23

Relativamente à concentração de biomassa, esta foi mais elevada no crescimento em XPA75 e MCA75 (5,28 g·L⁻¹ e 5,35 g·L⁻¹, respetivamente) comparativamente à biomassa produzida nas culturas às quais foram adicionadas XPA100 e MCA100.

Nie *et al.*(2013) e Li *et al.*(2007) também verificaram a diminuição da concentração de biomassa, com o aumento da concentração dos AT, o que atribuíram à inibição pelas elevadas concentrações de AT.

As produtividades em biomassa (P_x) foram aproximadamente iguais nos crescimentos para a mesma concentração de AT e as taxas volumétricas de consumo de fonte de carbono (r_c) foram superiores nos crescimentos em MCA, pelo que os rendimentos em biomassa em função da fonte de carbono (Y_{x/c}) foram superiores nos crescimentos em XPA.

O crescimento da levedura em MCA75 e MCA100 produziu menos de metade do conteúdo de carotenóides observado no crescimento em XPA75 e XPA100, como se pode observar na figura 10.

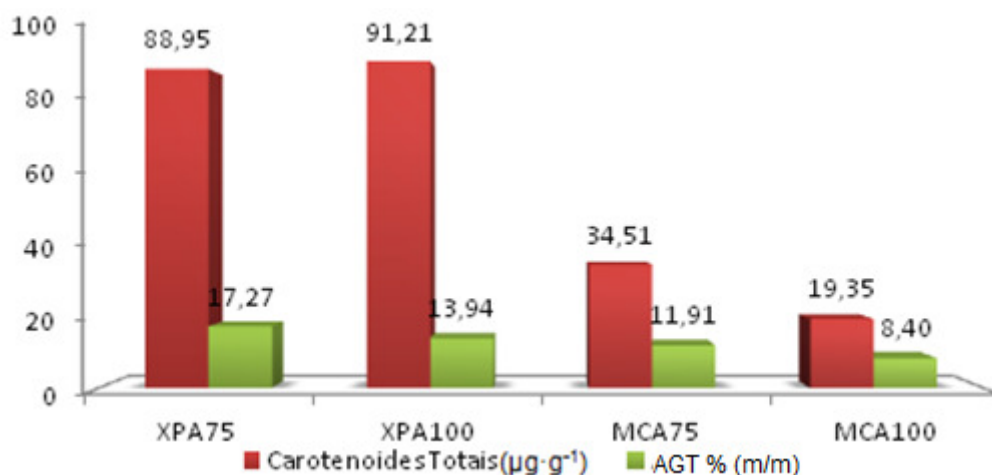


Figura 10- Teor de CT ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) e percentagem de AGT produzidos pela levedura *Rhodotorula glutinis* no crescimento em XPA75, XPA100, MCA75 e MCA100. [Os valores de AGT foram obtidos a partir de dois replicados independentes injetados duas vezes, com um desvio-padrão que não excedeu os 10% (n=4). Os valores de CT foram obtidos a partir da injeção de dois replicados, com um desvio-padrão que não excedeu os 10% (n=2).]

Este facto sugere que o MCA poderá conter compostos inibidores aos quais a levedura *R. glutinis* é mais susceptível, comparativamente aos inibidores presentes em XPA. Efetivamente, alguns compostos fenólicos presentes no MCA têm um efeito inibidor sobre as bactérias, como *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*, como descrito por Takara *et al.*(2007).

O teor em AGT atingiu o valor mais elevado no crescimento em XPA75 (17,27 % m/m) e o teor de CT máximo verificou-se no crescimento em XPA100 (91,21 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). No entanto observou-se o máximo rendimento e produtividade em AGT ($Y_{\text{AGT/C}}= 0,27 \text{ g}_{\text{AGT}}\cdot\text{g}_{\text{subs. consumido}}^{-1}$ e $P_{\text{AGT}}=0,02 \text{ g}_{\text{AGT}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, respetivamente) e CT ($Y_{\text{CT/C}}= 140,28 \text{ }\mu\text{g}_{\text{CT}}\cdot\text{g}_{\text{subs. consumido}}^{-1}$ e $P_{\text{CT}}= 9,79 \text{ }\mu\text{g}_{\text{CT}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, respetivamente) no crescimento em XPA75 (Tabela 5).

Nos diferentes crescimentos observou-se que o aumento da concentração de AT, quer no XPA quer no MCA, conduziu à diminuição das produtividades e rendimentos em biomassa, ácidos gordos e carotenóides (Tabela 5) sugerindo uma eventual inibição do crescimento e da síntese dos produtos (CT e AGT) pelo substrato tal como já referido acima. Outra possibilidade é a inibição do crescimento da levedura e síntese de produtos lipídicos (ácidos gordos e carotenóides) devido à presença de compostos inibidores em maiores concentrações, quando se aumentou a concentração de AT do XPA e do MCA.

Karatay *et al.*(2010) também observaram que o aumento da concentração de AT no MCA provocava a diminuição da acumulação de lípidos devido a um efeito tóxico do MCA sobre células de levedura, sem contudo especificar o mecanismo de

toxicidade. Valduga *et al.*(2007) observaram uma inibição do crescimento da levedura *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 e da produção de carotenóides quando desenvolvida em meio contendo MCA, o que atribuíram ao facto do melaço conter elevados níveis de potássio, cálcio, sódio, azoto, magnésio e ferro, que podem inibir o crescimento, por estarem envolvidos na inativação de enzimas associadas à biossíntese de carotenóides, sendo por isso necessário um pré-tratamento, por exemplo com carvão ativado, para remoção destes elementos.

Relativamente ao XPA, Lima *et al.*(2012), verificaram que este inibiu o crescimento da bactéria *Pseudomona putida*, quando presente numa concentração de 339 mg AT/g de massa seca de polpa de alfarroba. A temperatura elevada de extração poderá aumentar a concentração de compostos fenólicos no xarope de alfarroba, embora neste trabalho, a extração dos açúcares da polpa de alfarroba tenha sido efetuada à temperatura ambiente. De facto, segundo Turhan *et al.*(2010) e Petit e Pinilla (1995) a temperatura ideal de extração é a temperatura ambiente, pois permite obter um xarope rico em açúcares e com reduzido conteúdo em polifenóis (Turhan, Bialka, Demirci, & Karhan, 2010).

4.3.2 Composição em Ácidos gordos

A composição em ácidos gordos da levedura *R. glutinis*, quando cultivada em XPA e MCA, está apresentada na tabela 6.

Tabela 6- Composição em ácidos gordos dos lípidos produzidos pela levedura *R. glutinis* quando crescida em MCA e XPA nas concentrações de AT de 75 e 100 g·L⁻¹. [Os valores correspondentes aos ácidos gordos foram obtidos a partir de dois replicados independentes injetados em duplicado, com um desvio-padrão que não excedeu os 10% (n=4). É também apresentada a composição em ácidos gordos do óleo de soja para comparação (Adaptado de (Schneider, et al., 2013)).]

Ácidos gordos (%m/m)	Fonte de Carbono				
	XPA75	XPA100	MCA75	MCA100	Óleo de soja
Mirístico 14:0	1,17	1,28	1,29	1,58	
Palmítico 16:0	23,22	23,09	25,03	26,34	12
Palmitoleico 16:1ω9	0,83	1,03	0,95	1,28	
Esteárico 18:0	5,69	4,93	6,01	4,31	3
Oleico 18:1ω9	48,86	47,02	42,11	38,39	23
Linoleico 18:2ω6	16,16	18,40	20,02	22,39	55
Linolénico 18:3ω3	2,77	3,24	4,35	5,72	6
Araquídico 20:0	0,18	0,06	0,09		
Behénico 22:0					
Lignocérico 24:0	1,11	0,96	0,14		
Saturados	31,38	30,32	32,57	32,22	15
Monoinsaturados	49,70	48,04	43,06	39,67	23
Polinsaturados	18,93	21,64	24,38	28,11	61

Na tabela 6 observa-se que o perfil lipídico é semelhante ao já descrito para o género *Rhodotorula*, por outros autores (Saenge, Cheirsilp, Suksaroge, & Bourtoom, 2011) (Li, Zhao, & Bai, 2007) (Easterling, French, Hernandez, & Licha, 2009). Os ácidos gordos predominantes foram o oleico (18:1ω9) (38,39% - 48,86%), palmítico (16:0) (23,09% - 26,34%) e linoleico (18:2ω6) (16,16% - 22,39%), sendo as suas proporções diferentes das observadas nos crescimentos com fontes de carbono simples (Tabela 4).

Quando a levedura *R. glutinis* é cultivada em XPA, predomina a produção de ácidos gordos monoinsaturados, que chegam a atingir cerca de 50% m/m dos AGT, sendo 18:1 ω 9 o dominante. A mesma proporção também foi obtida por Dai *et al.*(2007) no crescimento da levedura *R. glutinis* em material lenhocelulósico (caule do milho e folhas de *Populus euramevicana*). Contudo, no crescimento em MCA, a levedura também produziu ácidos gordos monoinsaturados, mas numa proporção menor (\approx 41%).

De acordo com Stansell *et al.*(2012), a matéria-prima para a produção de biodiesel deve conter proporções elevadas de ácidos gordos monoinsaturados, mantendo as concentrações de todos os outros ácidos gordos tão baixas quanto possível. Assim, a levedura *R. glutinis* quando desenvolvida em meio contendo XPA e MCA produziu lípidos cuja composição apresentou uma proporção elevada de ácidos gordos monoinsaturados, portanto mais adequada para a produção de biodiesel do que a composição do óleo de soja, que contém apenas 23% de ácidos gordos monoinsaturados.

Os ésteres metílicos de ácidos gordos com quatro ou mais ligações duplas entre átomos de carbono da cadeia principal são susceptíveis à oxidação, pelo que, quando presentes no biodiesel, reduzem a sua qualidade (Lôbo, Ferreira, & Cruz, 2009). Como se pode verificar na Tabela 6, a levedura *R. glutinis* não produz ácidos gordos com quatro ou mais ligações duplas, confirmando-se que a composição em ácidos gordos dos lípidos produzidos por esta levedura é adequada para a produção de biodiesel.

Para além das produtividades e rendimentos mais elevados em biomassa, CT e AGT obtidos no crescimento em XPA75, os ácidos gordos produzidos encontram-se nas proporções mais indicadas para a produção de biodiesel.

4.3.3 Composição em carotenóides

Perrier *et al.*(1995) e Aksu *et al.* (2007) referem que o carotenóide produzido em maior quantidade nos crescimentos de várias espécies de *Rhodotorula*, em glucose, é o β -caroteno.

Na Tabela 7 observa-se que no crescimento em XPA75 o teor em toruleno é duas vezes maior do que o teor em β -caroteno. No crescimento em XPA100, o teor em toruleno é 1,5 vezes maior do que o β -caroteno. Verificou-se ainda que o teor em toruleno foi aproximadamente 3,6 e 3 vezes maior do que o teor em β -caroteno, nos crescimentos em MCA75 e MCA100, respetivamente. Bhosale e Gadre (2001) também obtiveram maior teor em toruleno no crescimento da levedura *R. glutinis* NCIM 3353 em MCA, desenvolvida em frascos agitados.

Em todos os crescimentos foi possível verificar que a torularodina foi o carotenóide presente em menor quantidade.

Tabela 7- Teor de β -caroteno, toruleno e torularodina da levedura *R. glutinis* NRRL Y-1091 desenvolvida em XPA75, XPA100, MCA75 e MCA100. [Os valores de cada um dos pigmentos foram obtidos a partir de injeção de dois replicados, com um desvio-padrão que não excedeu os 10% (n=2).]

Fonte de Carbono	Carotenóides produzidos por <i>R. glutinis</i>			
	β -caroteno ($\mu\text{g}\cdot\text{g}_{\text{biomassa}}^{-1}$)	Toruleno ($\mu\text{g}\cdot\text{g}_{\text{biomassa}}^{-1}$)	Torularodina ($\mu\text{g}\cdot\text{g}_{\text{biomassa}}^{-1}$)	CT ($\mu\text{g}\cdot\text{g}_{\text{biomassa}}^{-1}$)
XPA75	24,60	50,16	14,23	88,95
XPA100	32,30	47,45	11,47	91,21
MCA75	6,60	23,78	4,14	34,51
MCA100	4,02	11,60	3,73	19,35

O interesse industrial em carotenóides tem vindo a alterar-se gradualmente. Os carotenóides amarelos como o β -caroteno eram considerados de maior valor acrescentado. Hoje em dia, os carotenóides laranja-vermelho como o toruleno e a torularodina, para os quais não existe presentemente uma fonte animal ou vegetal para comercialização, são considerados mais interessantes (Latha & Jeevaratnam, 2010). Desta forma, todos os carotenóides produzidos pelas leveduras do género *Rhodotorula* têm interesse comercial, independentemente da proporção entre eles (Frengova & Beshkova, 2009).

Relativamente aos CT, observa-se na tabela 7 que os crescimentos da levedura em XPA75 e XPA100 proporcionaram um teor de CT 2,6 e 4,7 vezes maior do que os crescimentos em MCA75 e MCA100, respetivamente.

4.3.4 Citometria de fluxo

À semelhança do ensaio anterior com as fontes de carbono individuais (secção 4.2.3), avaliou-se a viabilidade celular das culturas de *R. glutinis* desenvolvidas em XPA e MCA ao fim de 48 h, através da avaliação do potencial das membranas citoplasmática e mitocondrial e da integridade da membrana citoplasmática, utilizando a citometria de fluxo em associação com a mistura de corantes DiOC₆(3) e IP.

A figura 11 mostra os gráficos de densidade de células da levedura *R. glutinis*, coradas com DiOC₆(3)+IP, cujo crescimento ocorreu em XPA75, XPA100, MCA75 e MCA100.

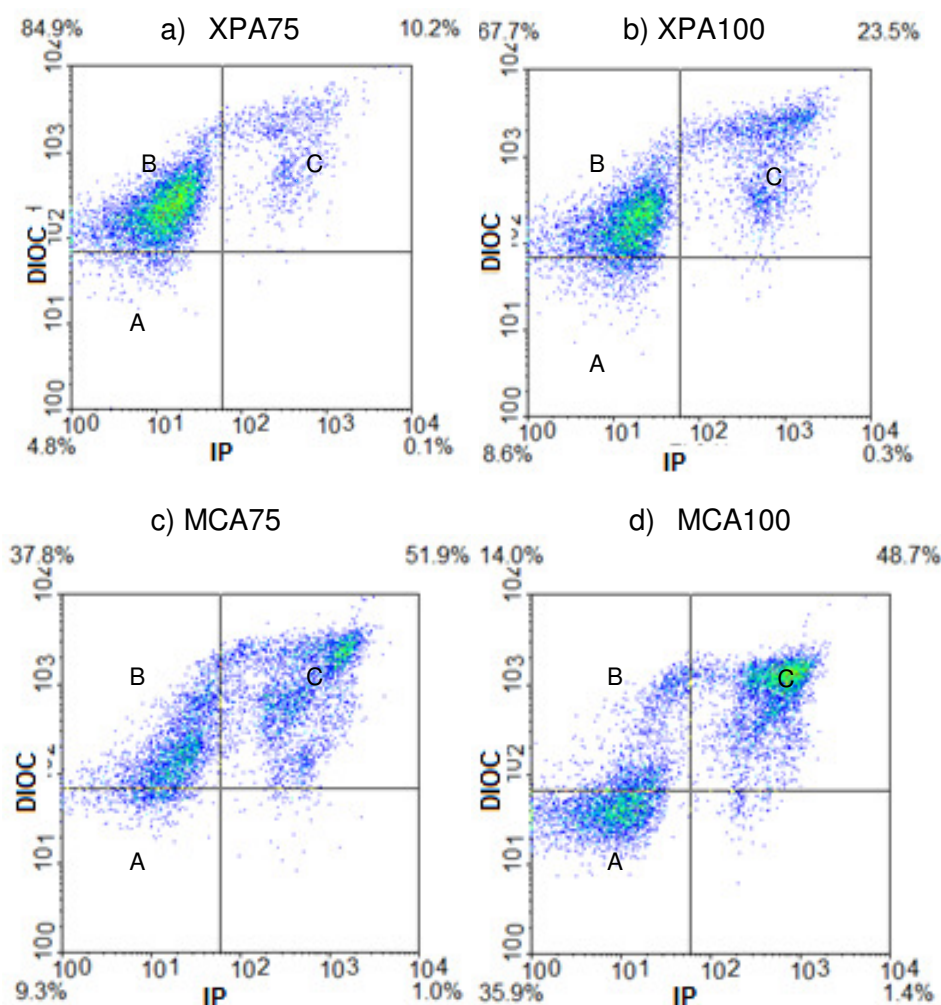


Figura 11 Gráficos de densidade de células de *Rhodotorula glutinis* coradas com IP e DiOC₆(3), ensaio em a) XPA75, b) XPA100 c) MCA75 d) MCA100.

Na figura 11 observa-se que, no crescimento em XPA75, a cultura apresenta uma maior percentagem da subpopulação B (cerca de 85%), correspondente a células com membranas intactas e polarizadas (Figura 11a), seguido do crescimento em XPA100, apresentando uma proporção de 68% para a subpopulação B e, por fim, o crescimento em MCA75 e MCA100 com uma proporção de subpopulação B de ≈38% e 14%, respetivamente.

A subpopulação C, correspondente a células com membrana citoplasmática permeabilizada, aumentou nos crescimentos com XPA75 e XPA100 de 10,2% para 23,3%, respetivamente, enquanto a proporção desta subpopulação foi semelhante nos crescimentos em MCA75 e MCA100 (≈50%). Sendo esta subpopulação composta por células que não participam no bioprocesso, o aumento da sua proporção na cultura de *R. glutinis* explica a menor produção de AGT e CT, nas culturas de MCA75 e MCA100 (Tabela 7) sugerindo, uma vez mais, que o MCA contém compostos inibidores que induzem um nível de stresse mais elevado nas células da levedura do que o XPA.

Efetivamente, Heipieper *et al.* (1994) referiram que alguns compostos fenólicos podem atuar nas membranas biológicas, provocando a perda da sua integridade.

Na levedura *R. glutinis*, a síntese de ácidos gordos necessita de ATP (Easterling, French, Hernandez, & Licha, 2009). Uma vez que a perda de integridade da membrana afeta a produção de ATP (Almeida, Modig, Petersson, Hahn-Hagerdal, Lidén, & Gorwa-Grauslund, 2007), haverá menos energia disponível para a síntese de ácidos gordos, diminuindo a sua produtividade.

Por outro lado, verificou-se que, tanto no crescimento em XPA, como em MCA, o aumento de concentração de AT resultou no aumento da percentagem de células com membranas citoplasmática e mitocondrial despolarizadas (subpopulação A). De facto, o aumento da concentração de AT resultou num aumento da concentração de sais, com o consequente aumento da pressão osmótica do meio, o que poderá ter contribuído para danificar as células. Foi também referido por Roukas (1996) que, em elevadas concentrações de MCA, há diminuição da atividade da água e as células podem sofrer plasmólise. Aumenta também a concentração dos agentes inibidores presentes no meio, o que contribui para a redução da população de células metabolicamente ativas, como já foi referido.

Através da citometria de fluxo, associada à dupla coloração DiOC₆(3)+IP, foi possível confirmar que o crescimento da levedura *R. glutinis* em XPA75 (Figura 11a) resulta numa menor proporção de células permeabilizadas (subpopulação C) e menor proporção de células despolarizadas (subpopulação A). Note-se que as células da subpopulação A, poderão eventualmente recuperar o potencial das suas membranas mitocondrial e citoplasmática, evoluindo para a subpopulação B em condições nutricionais favoráveis (Lopes da Silva, Reis, Hewitt, & Roseiro, 2004). Estes resultados obtidos por citometria de fluxo estão de acordo com as elevadas produtividades obtidas em AGT e CT para esta concentração de AT no XPA (Tabela 5).

4.4 Resultados do Planeamento Experimental

Após seleção da fonte de carbono que proporcionou maior produtividade em lípidos e carotenóides (XPA), otimizaram-se as condições de cultivo da levedura, relativamente à concentração de AT da fonte de carbono selecionada (xarope de polpa de alfarroba) e à disponibilidade de oxigénio (variando o volume do meio), através do planeamento de *Doehlert*.

Na tabela 8 podem observar-se os resultados obtidos pelo planeamento experimental do crescimento da levedura *R. glutinis*, em diferentes condições de cultura.

Tabela 8- Concentração de biomassa (X) ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), AGT (% m/m) e CT ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), percentagem de células polarizadas, despolarizadas e permeabilizadas e consumo de AT ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e azoto ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) da levedura *R. glutinis* em crescimentos sob diferentes condições de concentração de AT e transferência de oxigénio. [Os valores de biomassa foram obtidos a partir de duplicados independentes, com um desvio-padrão que não ultrapassou 10% (n=2); Os valores de CT foram obtidos a partir de injeção de dois replicados Os valores de CT foram obtidos a partir da injeção de dois replicados, com um desvio-padrão que não excedeu os 10% (n=2); Os valores correspondentes aos AGT foram obtidos a partir de dois replicados independentes injetados em duplicado, com um desvio-padrão que não excedeu os 10% (n=4); Os valores de azoto foram obtidos a partir de amostras sem replicado (n=1) e os valores de AT foram obtidos a partir de amostras injetadas em duplicado, com um desvio-padrão que não excedeu 10% (n=2).]

Testes	pH (t=48 h)	AT ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Volume (mL)	X ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	CT ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	AGT(% m/m)	Células Polarizadas (%)	Células Despolarizadas (%)	Células Permeabilizadas (%)	Consumo de AT ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Consumo de Azoto ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
1	4,81	82,5	250	6,68	19,90	19,75	88,10	3,80	8,00	35,33	0,35
2	4,80	82,5	250	4,43	21,42	19,54	87,00	5,20	7,80	33,72	0,87
3	4,75	130,0	250	7,23	25,27	15,76	73,40	3,20	23,20	29,10	0,26
4	4,76	130,0	250	6,10	22,10	15,57	74,70	7,80	17,40	29,32	0,37
5	5,29	35,0	250	5,48	14,13	21,03	90,40	6,90	2,70	24,07	0,38
6	5,18	35,0	250	4,98	14,81	21,01	89,60	6,90	3,40	19,67	0,23
7	4,77	106,3	380	7,80	26,50	14,90	88,70	0,90	10,40	33,10	0,37
8	4,85	106,3	380	8,70	27,60	14,89	91,20	3,10	5,60	22,51	0,31
9	4,90	58,8	120	6,77	16,46	18,93	80,60	14,00	5,30	16,17	0,29
10	4,86	58,8	120	6,62	20,32	20,35	83,50	11,00	5,50	24,87	0,25
11	4,60	106,3	120	7,82	26,92	16,95	76,30	0,80	22,90	31,89	0,28
12	4,60	106,3	120	7,67	30,63	19,63	71,20	2,70	26,00	31,87	0,49
13	4,83	58,8	380	6,10	20,87	19,72	94,30	3,00	2,70	29,51	0,45
14	4,78	58,8	380	6,02	36,96	19,74	92,90	4,00	3,10	21,12	0,32

]

A máxima concentração de biomassa ($8,25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) foi obtida num volume de meio de cultura de 380 mL e numa concentração de AT de $106,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Verifica-se que o aumento da concentração de AT de 35 para $130 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (testes 3, 4, 5 e 6) na cultura de *R. glutinis* aumenta a produção de biomassa em 27,5 %, (de $5,23$ a $6,67 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) (volume constante no centro domínio), indicando que o açúcar é um nutriente limitante relativamente à produção de biomassa, nestas condições experimentais. O mesmo foi obtido por Li *et al.*(2007) que concluíram que o aumento de concentração de glucose no meio aumentava a produção de biomassa pela levedura *Rhodosporidium toruloides* e Aksu *et al.*(2007) verificaram que o aumento da concentração inicial de sacarose aumenta a produção de biomassa pela levedura *R. glutinis*.

Quando a concentração de AT aumenta num volume de 120 mL (testes 9, 10, 11 e 12) a biomassa aumenta 15,7% (de $6,70$ a $7,75 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). Para o mesmo aumento de concentração mas num volume de 380 mL (testes 7, 8, 13 e 14), há um aumento de biomassa de 36,1% (de $6,06$ a $8,25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). Estes resultados indicam que o crescimento da levedura *R. glutinis* em XPA é mais eficiente em condições com menos oxigénio disponível (mais volume do meio de cultura). Matsunaka *et al.* (1966) verificaram que a levedura *Rhodotorula glutinis* consome menos de metade do oxigénio consumido pela *Saccharomyces cerevisiae*, comparativamente.

A máxima concentração em CT ($28,92 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) foi obtida num crescimento com 380 mL de meio com concentração em AT de $58,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Pode observar-se que no centro do domínio experimental, a produção de carotenóides segue uma tendência semelhante à biomassa. Com o aumento da concentração de AT, a produção de CT aumenta 63,6%, de $14,47$ a $23,68 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (testes 3, 4, 5 e 6), como observado por Saenge *et al.*(2011) e Aksu *et al.*(2007).

O aumento da concentração de AT, num volume constante de 120 mL (testes 9, 10, 11 e 12) aumenta a concentração de CT em 56,5% (de $18,39$ a $28,78 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Para o mesmo aumento de concentração de AT mas num volume de 380 mL (testes 7, 8, 13 e 14) a concentração de CT mantém-se.

Para baixas concentrações de AT ($58,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), o aumento do volume de 120 para 380 mL (testes 9, 10, 13 e 14), aumenta a concentração de CT em 56,5% (de $18,39$ a $28,92 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Para elevadas concentrações de AT ($106,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), o mesmo aumento de volume (testes 7, 8, 11 e 12) não altera a concentração de CT (de $28,78$ a $27,05 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$).

Relativamente à produção de AGT, na tabela 8 verifica-se que o aumento da concentração de AT no XPA de 35 para $130 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (testes 3, 4, 5 e 6) diminui em 25,2 % o conteúdo em AGT de 21,0 para 15,7% (m/m). É ainda possível verificar que num

volume de 250 mL, a percentagem de ácidos gordos diminui 0,056% por cada grama de AT.

Num volume de 120 mL, o teor de AGT mantém-se com o aumento da concentração de AT (testes 9, 10, 11 e 12) (de 19,64 para 18,29% m/m). Para o mesmo aumento de concentração mas num volume de 380 mL (testes 7, 8, 13 e 14) há uma diminuição do conteúdo em AGT de 24,49% (de 19,73 a 14,90% m/m). Estes dados revelam que a baixa disponibilidade em oxigénio não favorece a produção de ácidos gordos, o que está de acordo com o estudo feito por Galafassi *et al.*(2012). Este estudo utilizou uma levedura da espécie *Rhodotorula* desenvolvida em fermentador, onde é possível manter maiores concentrações de oxigénio dissolvido (comparativamente aos frascos agitados), resultando numa maior produtividade de lípidos.

O mesmo é possível verificar nos testes em que o volume de meio é alterado. Para baixas concentrações de AT ($58,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), para um aumento do volume de 120 para 380 mL (testes 9, 10, 13 e 14), não há alteração no teor em AGT. Para o mesmo aumento de volume (diminuição da disponibilidade de oxigénio), mas para concentrações elevadas de AT ($106,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) (testes 7, 8, 11 e 12), verifica-se uma diminuição da produção de AGT em 18,53 % (de 18,29 a 14,90% m/m). A diminuição da disponibilidade de oxigénio reduz a acumulação de ácidos gordos nas células, encontrando-se de acordo com o referido por Choi *et al.*(1982) que indicam que o processo de produção de lípidos pela levedura *Rhodotorula glacilis* é favorecido com elevado teor de oxigénio no meio.

Relativamente à percentagem de células polarizadas, verifica-se que num volume de cultura de 250 mL, o aumento da concentração de AT de 35 para $130 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (testes 3, 4, 5, 6) diminui a percentagem de células saudáveis/polarizadas em 17,7% (de 90,00% para 74,05%).

Com o aumento da concentração de AT num volume de 120 mL (testes 9, 10, 11 e 12) a percentagem de células polarizadas diminui 10,1% (de 82,05% para 73,75%). Com a mesma variação da concentração de AT, num volume de 380 mL (testes 7, 8, 13 e 14) apenas se verifica um descréscimo de 3,9% (de 93,60% para 89,95%) de células polarizadas.

Para baixas concentrações de AT ($58,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) o aumento do volume, ou seja a diminuição do oxigénio dissolvido (testes 9, 10, 13 e 14), aumenta a percentagem de células polarizadas 14,1% (de 82,05% para 93,60%). Para elevadas concentrações de AT ($106,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), o aumento do volume aumenta a percentagem de células polarizadas.

Relativamente à percentagem de células despolarizadas, é possível verificar através da tabela 8 que o aumento da concentração de AT num volume de 120 mL (testes 9, 10, 11 e 12) diminui a percentagem de células despolarizadas de 12,50% para 1,75%. Enquanto que o mesmo aumento da concentração de AT num volume de 380 mL (testes 7, 8, 13 e 14) apenas diminui a percentagem de células despolarizadas de 3,50 para 2,00%.

Observa-se também que o aumento de volume de 120 para 380 mL numa concentração de AT de $58,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (testes 9, 10, 13 e 14) diminui a percentagem de células despolarizadas de 12,50% para 3,50%, mas para o mesmo aumento de volume em concentrações elevadas de AT ($106,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) (testes 7, 8, 11 e 12) a percentagem de células despolarizadas mantém-se.

No centro do domínio experimental, o aumento da concentração de AT (testes 3, 4, 5 e 6), aumenta a percentagem de células permeabilizadas de 3,05% para 20,30%, seguindo a tendência de decréscimo da percentagem de células polarizadas. A escassez de oxigénio tem um efeito protetor sobre a cultura, como se pode observar nos testes 9, 10, 11 e 12, em que para um volume constante de 120 mL o aumento da concentração de AT aumenta a percentagem de células permeabilizadas de 5,40% para 24,45%. O mesmo aumento de concentração, num volume de 380 mL, portanto, com menor disponibilidade de oxigénio, (testes 7, 8, 13 e 14), aumenta apenas de 2,90% para 8,00%, a percentagem de células permeabilizadas.

Para baixas concentrações de AT ($58,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), com o aumento de volume de 120 mL para 380 mL (testes 9, 10, 13 e 14) a percentagem de células permeabilizadas diminuiu 46,3% (de 5,40 para 2,90). Para elevadas concentrações de AT ($106,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), a mesma alteração de volume (testes 7, 8, 11 e 12) diminuiu a percentagem de células permeabilizadas 67,3% (de 24,45% para 8,00%).

Relativamente ao consumo da fonte de carbono e azoto, é possível observar através da Tabela 8, que em meios com elevada disponibilidade de oxigénio (120 mL) o aumento da concentração de AT induziu o aumento do consumo da fonte de carbono ($\approx 55\%$ de 20,52 para $31,88 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) (testes 9, 10, 11 e 12), pois a levedura dispõe de oxigénio suficiente para consumir mais açúcares quando aumentamos a sua concentração. Tendo mais energia disponível, produziu mais biomassa e carotenóides, e aumentou o consumo de fonte de azoto de 0,27 para $0,39 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, para sua integração nos constituintes celulares. Em meios com baixa disponibilidade de oxigénio (380 mL), o aumento da concentração de AT (testes 7, 8, 13 e 14) induziu o consumo da fonte de carbono em apenas 9,8% (de 25,81 para $27,81 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), pois a levedura já não tem tanto oxigénio disponível como aceitador final de eletrões. Tendo menos energia

disponível há diminuição da produção de carotenóides e ácidos gordos e, por isso, menor consumo de azoto.

A importância relativa de cada fator na resposta é representada pelos valores dos fatores β no modelo linear, apresentados na tabela 9.

Tabela 9- Parâmetros do modelo polinomial representativos das respostas estudadas. β_0 , resposta no centro do domínio experimental; β_1 e β_2 , parâmetros dos fatores 1 e 2 respetivamente; β_{12} , parâmetro da interação dos fatores 1 e 2.

Parâmetros do modelo	X	AGT	CT	Células polarizadas	Células Despolarizadas	Células permeabilizadas
β_0	5,56	19,65	20,66	87,56	4,50	7,90
β_1 -[AT]	1,02	-2,82	4,49	-7,31	-2,51	9,78
β_2 -Oxigénio	-0,04	-0,95	2,54	8,01	-2,53	-5,47
β_{12}	0,66	-2,01	-7,07	2,68	5,34	-8,05
β_{11}	0,39	-1,31	-1,59	-5,54	1,70	3,77
β_{22}	2,04	-1,58	7,35	-1,80	0,02	1,79

A influência da concentração de AT ($\beta_1=1,02$) na produção de biomassa é muito mais significativa do que o volume de meio ($\beta_2= -0,04$) que tem uma leve influência negativa, tal pode ser observado na figura 12a, na qual as curvas de isoresposta estão mais próximas da posição horizontal, indicando que para um valor fixo de oxigénio, pequenas variações na concentração de AT provocam alterações significativas na produção de biomassa. A interação dos dois fatores ($\beta_{12}=0,66$) tem um efeito positivo na resposta (biomassa), sendo mais relevante do que o volume do meio.

Na produção de AGT a concentração de AT tem maior importância ($\beta_1=-2,82$) do que o volume de meio de cultura ($\beta_2=-0,95$).

Relativamente à produção de CT, verifica-se que a concentração de AT ($\beta_1= 4,49$) tem maior importância do que o volume do meio ($\beta_2=2,54$). A interação dos dois fatores tem um efeito negativo ($\beta_{12}=-7,07$) mostrando o forte efeito do volume em meios com baixa disponibilidade de oxigénio.

O volume elevado de meio (menos oxigénio disponível) tem uma contribuição positiva na percentagem de células polarizadas ($\beta_2= 8,01$) e tem menor efeito na diminuição de células permeabilizadas ($\beta_2=-5,47$) do que a concentração de AT ($\beta_1= 9,78$). Relativamente às células despolarizadas, a concentração de AT e o volume do meio demonstram ter a mesma importância, ambos com valores negativos ($\beta_1=-2,51$ e $\beta_2=-2,53$).

Na figura 12a é possível verificar que a produção de biomassa aumenta com o aumento da concentração de AT em toda a gama de variação de volume de meio.

Nas figuras 12b e c, observa-se as curvas de isoresposta correspondentes ao consumo da fonte de carbono e azoto, respetivamente.

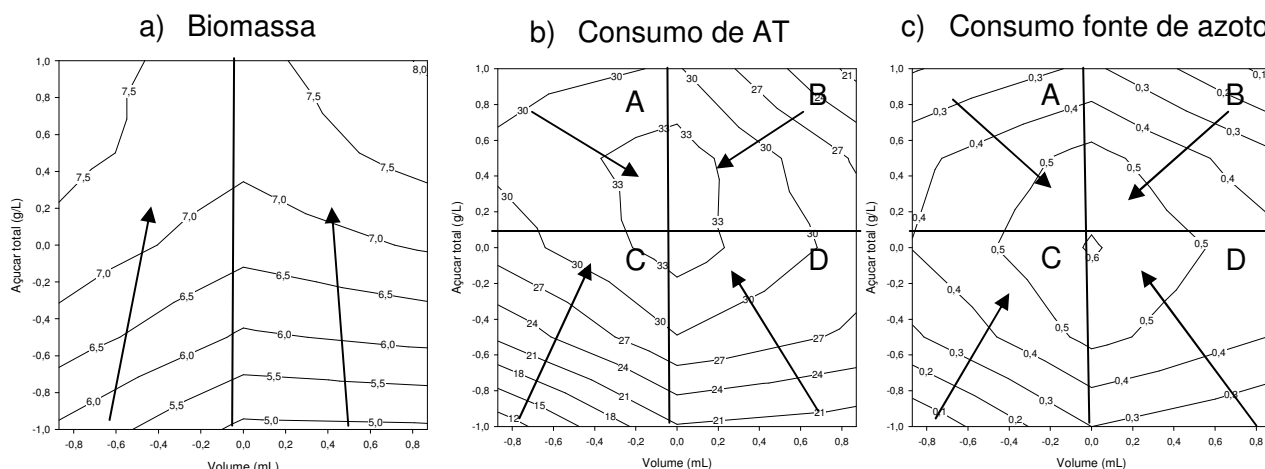


Figura 12- Superfícies de resposta correspondentes à **a)** biomassa produzida, **b)** açúcar consumido e **c)** azoto consumido.

No gráfico de consumo de carbono (Figura 12b) observa-se que em todos os quadrantes (A, B, C e D) há dupla limitação, isto é, a variação da concentração de AT e do volume do meio de cultura provoca alteração no consumo de AT. O mesmo se verifica relativamente ao consumo da fonte de azoto (Figura 12c). Contudo, pode verificar-se que a influência de cada um dos agentes limitantes nos diferentes quadrantes varia. Nos quadrantes A e B da figura 12b, a concentração de AT parece influenciar tanto como o oxigénio disponível enquanto que, nos quadrantes C e D, a concentração de AT é o agente com maior influência e, por isso, as curvas de isoresposta nestes quadrantes são tendencialmente horizontais, paralelas ao eixo do X.

Ainda relativamente ao gráfico de consumo da fonte de azoto (Figura 12c) pode observar-se que em meios com elevada disponibilidade de oxigénio (A e C), o aumento da concentração de AT conduz ao aumento do consumo de fonte de azoto. A levedura tem oxigénio suficiente para converter a fonte de carbono em energia, energia essa que é conduzida para a produção de biomassa, verificando-se por isso um aumento da sua produção (Figura 12a), na qual há incorporação do azoto e por isso o seu maior consumo. Contudo, em concentrações muito elevadas de AT a levedura não tem capacidade de processar todo o açúcar disponível e abrandando o seu consumo (Figura 12b (A)), possivelmente devido à menor percentagem de células polarizadas (Figura 13a).

Em meios com baixa disponibilidade de oxigénio, concentrações de AT muito elevadas diminuem o consumo do mesmo, pois não há oxigénio suficiente disponível

como aceitador final (Figura 12b (B)), diminuindo a energia disponível para a produção de biomassa, conduzindo à diminuição da integração de compostos azotados (Figura 12c (B)).

Na Figura 13, observam-se as curvas de isoresposta correspondentes às percentagens de células polarizadas, despolarizadas e permeabilizadas.

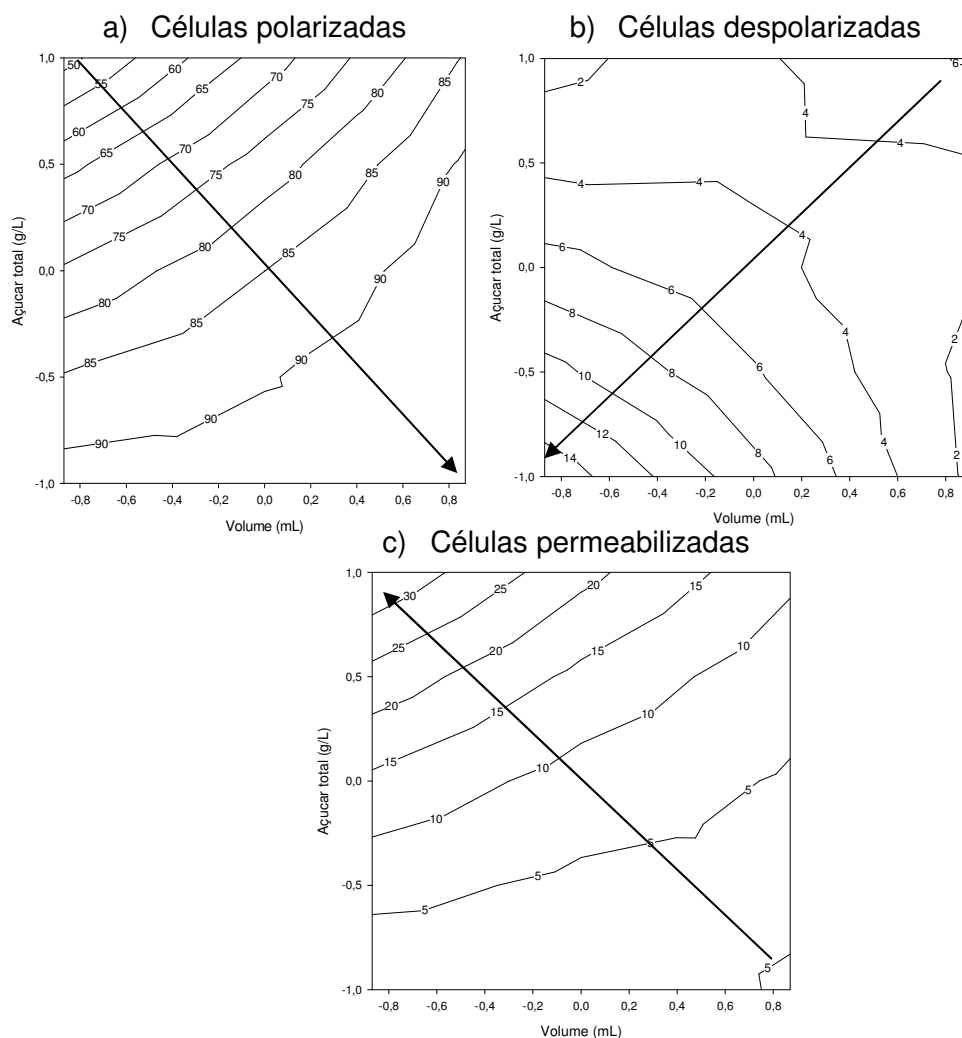


Figura 13- Superfícies de resposta correspondentes a **a)** células polarizadas, **b)** células despolarizadas e **c)** células permeabilizadas.

Nas figuras 13a e c, pode verificar-se que em meios com baixas concentrações de AT, há uma maior percentagem de células com membrana citoplasmática e mitocondrial polarizada, e consequentemente uma menor percentagem de células com membranas permeabilizadas.

Em meios com maior disponibilidade de oxigénio, o aumento da concentração de AT aumenta a concentração de possíveis inibidores presentes na fonte de carbono complexa e por isso se verifica uma maior proporção de células com membrana citoplasmática permeabilizada (testes 11 e 12) (24,45%).

Relativamente à tendência da percentagem de células despolarizadas (Figura 13b), verifica-se que a sua percentagem aumenta com a diminuição das concentrações de AT e com o aumento da disponibilidade de oxigénio, possivelmente porque nestas condições as células apesar de disporem de oxigénio suficiente, não têm fonte de carbono suficiente disponível para obterem energia.

A superfície de resposta correspondente à produção de CT (Figura 14), mostra um comportamento distinto entre os quadrantes do lado esquerdo e os quadrantes do lado direito, ou seja, entre meios com mais e menos oxigénio disponível.

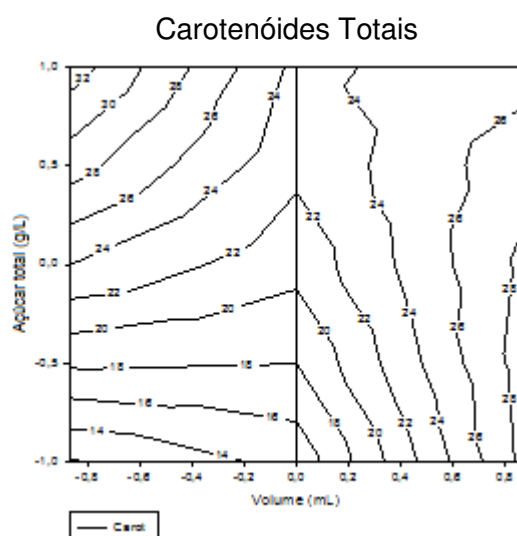


Figura 14- Superfície de resposta CT, produzidos pela levedura *R. glutinis*.

Nos quadrantes do lado esquerdo, as linhas de iso-resposta são paralelas ao eixo do X, indicando que em meios com mais oxigénio disponível, a concentração em AT tem maior importância. Nos quadrantes do lado direito (menor disponibilidade de oxigénio) mostram o contrário: alterações no volume do meio induzem alterações significativas na resposta (carotenóides), enquanto a concentração de AT não altera consideravelmente. Assim sendo, a produção de CT é controlada pela concentração de AT quando há elevada disponibilidade de oxigénio, mas é controlada pelo oxigénio, quando a concentração de AT é baixa.

Em meios com elevada disponibilidade de oxigénio e AT, existe maior disponibilidade de energia que é direcionada para a produção de carotenóides.

A figura 15 corresponde à superfície de resposta dos AGT.

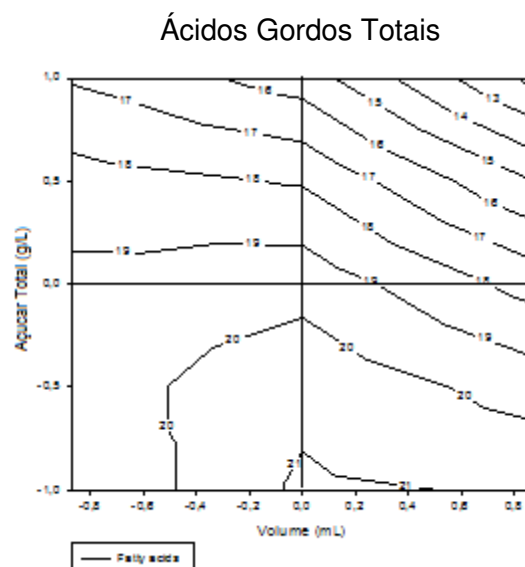


Figura 15- Superfície de resposta dos AGT, produzidos pela levedura *R. glutinis*.

Em meios com pouca disponibilidade de oxigênio e elevada concentração de AT, as células não encaminham a pouca energia disponível para a produção de lípidos ou carotenóides. Isto é, em condições de baixa disponibilidade de oxigênio e elevada concentração de AT, a concentração de ATP é reduzida e a célula reduz a síntese de metabolitos primários como os carotenóides e secundários como os ácidos gordos, e utiliza essa pouca energia para a sobrevivência, o que se reflete numa elevada proporção de células polarizadas (Figura 13a) e numa reduzida produção de AT (Figura 15).

A superfície de resposta correspondente aos ácidos gordos (Figura 15) apresenta linhas de isoresposta com tendência para a horizontalidade, indicando que a concentração de AT é o fator mais importante na produção de ácidos gordos, encontrando-se de acordo com os valores β obtidos ($\beta_1 = -2,82$ e $\beta_2 = -0,95$), sendo que ambos apresentam valores negativos.

É possível observar que a produção de ácidos gordos é favorecida em meios com maior disponibilidade de oxigênio, pois a levedura para os produzir necessita de mais energia.

Tabela 10- Produtividade de biomassa (P_X) ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$), CT (P_{CT}) ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) e AGT (P_{AGT}) ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)

Testes	AT ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Volume (mL)	P_X ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	P_{CT} ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	P_{AGT} ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)
1	82,5	250	0,14	2,75	0,028
2	82,5	250	0,09	1,80	0,018
3	130,0	250	0,15	2,37	0,024
4	130,0	250	0,13	1,98	0,020
5	35,0	250	0,11	2,40	0,024
6	35,0	250	0,10	2,18	0,022
7	106,3	380	0,16	2,42	0,024
8	106,3	380	0,18	2,70	0,027
9	58,8	120	0,14	2,67	0,027
10	58,8	120	0,14	2,80	0,028
11	106,3	120	0,16	2,76	0,028
12	106,3	120	0,16	3,14	0,031
13	58,8	380	0,13	2,51	0,025
14	58,8	380	0,13	2,47	0,025

As condições onde se verificam maior produtividade em AGT e CT não coincidem com a máxima produtividade de biomassa ($0,18 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$), tal como referido por Saenge *et al.*(2011) que referem que as condições experimentais que proporcionam maior produção de biomassa pela levedura *R. glutinis* TISTR 5159, são as condições que provocam a redução do conteúdo em carotenóides. Contudo, nestas condições, a produtividade de biomassa apresenta o segundo melhor valor ($0,16 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$).

As produtividades de CT e AGT mais elevadas ($3,14 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e $0,031 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, respetivamente) foram obtidas no menor volume de meio (120 mL) (Tabela 10), isto é, com mais oxigénio dissolvido e quando a fonte de carbono se encontra em concentrações elevadas ($106,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), tal como obtido por Aksu *et al.*(2007), que verificaram também que o aumento da concentração inicial de glucose e sacarose no meio aumentava, progressivamente, a produtividade de carotenóides produzidos pela levedura *R. glutinis*.

Na tabela 10 pode também observar-se que numa concentração de AT de $106,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e num volume de 380 mL de meio obtém-se o terceiro melhor valor de produtividade em CT ($2,70 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) e uma produtividade menor de AGT. Esta situação seria mais benéfica do ponto de vista industrial pois não exige tantos gastos energéticos.

4.4.1 Resultados da análise estatística

Os valores críticos calculados em ambos os testes F foram utilizados para testar a eficácia dos parâmetros e do desajuste e estão representados na tabela 11. Os testes F foram estatisticamente significativos no nível de significância indicado.

Tabela 11- Valores críticos calculados em ambos os testes F.

		X	CT	AGT	Células Polarizadas	Células Despolarizadas	Células Permeabilizadas
Teste de Fischer	Eficácia dos parâmetros	4,47	3,91	20,57	144,41	1,43	27,35
	Nível de significância F(5,8)	$\alpha \leq 0,01$	$\alpha \leq 0,01$	$\alpha \leq 0,1$	$\alpha \leq 0,1$	$\alpha \leq 0,01$	$\alpha \leq 0,1$
	Desajuste	2,05	0,01	0,34	0,05	5,13	1,40
	Nível de significância F(1,7)	$\alpha \leq 0,01$	$\alpha \leq 0,01$	$\alpha \leq 0,01$	$\alpha \leq 0,01$	$\alpha \leq 0,01$	$\alpha \leq 0,01$
R²		0,74	0,71	0,93	0,99	0,47	0,94

5. Conclusões

Este trabalho teve como objetivo a otimização das condições de cultivo da levedura *R. glutinis* NRRL Y-1091, com vista à máxima produtividade de ácidos gordos e de carotenóides.

Das fontes de carbono simples estudadas, concluiu-se que a sacarose foi a que proporcionou maior produção de biomassa, maior produtividade em ácidos gordos e carotenóides e uma menor percentagem de células permeabilizadas.

Relativamente aos crescimentos em fontes de carbono complexas, os resultados sugerem que o xarope de polpa de alfarroba é uma fonte de carbono adequada para a produção de carotenóides e ácidos gordos pela levedura *R. glutinis*. Pelo contrário, no crescimento da levedura em melaço de cana de açúcar verificaram-se produtividades em carotenóides e ácidos gordos inferiores e uma maior proporção de células com membrana permeabilizada.

A citometria de fluxo multiparamétrica foi uma importante ferramenta utilizada, pois permitiu avaliar o teor em carotenóides produzidos pela levedura e analisar de forma rápida, e em tempo real, o estado fisiológico das células durante o crescimento nestes substratos.

Através do planeamento experimental concluiu-se que as condições que proporcionaram maior produtividade de ácidos gordos e carotenóides corresponderam a um volume de cultura de 120 mL e a uma concentração de AT de 106,3 g·L⁻¹. Contudo, as condições nas quais se verificou a máxima produtividade média de biomassa não coincidiram, tendo esta sido observada num volume de meio de 380 mL e numa concentração de AT de 106,3 g·L⁻¹.

Os resultados deste estudo sugerem que o xarope de polpa de alfarroba é, das fontes de carbono estudadas, uma promissora fonte de carbono para a produção de lípidos, para biodiesel, e carotenóides como aditivos alimentares, pela levedura *Rhodotorula glutinis*.

6. Bibliografia

Ajanovic, A. (2011). Biofuels versus food production: Does biofuels production increase food prices? *Energy* , 2070-2076.

Aksu, Z., & Eren, A. (2007). Production of carotenoids by isolated yeast of *Rhodotorula glutinis* . *Biochemical Engineering* , 107-113.

Alegre, R., Rigo, M., & Joekes, I. (2003). Ethanol fermentation of a diluted molasses medium by *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on Chrysotile. *Brazilian archives of biology and technology* , 751-757.

Almeida, J., & Quirino, L. (2012). Biodiesel biorefinery: opportunities and challenges for microbial production of fuels and chemicals from glycerol waste. *Biotechnology for Biofuels* .

Almeida, J., Modig, T., Petersson, A., Hahn-Hagerdal, B., Lidén, G., & Gorwa-Grauslund, M. (2007). Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of chemical technology and biotechnology* , 82, 340-349.

Alvarez, R., Rodriguez, B., Romano, J., Diaz, A., Gómez, E., Miró, D., et al. (1992). Lipid accumulation in *Rhodotorula glutinis* on sugar cane molasses in single-stage continuous culture. *World journal of microbiology and biotechnology* , 214-215.

Andrade, R. (2010). Estudo do desenvolvimento e da produtividade lipidica da levedura *Rhodotorula glutinis* NCYC 921 em culturas descontínuas monitorizadas por citometria de fluxo. *Dissertação para obtenção do grau de mestre em Biotecnologia, Universidade Nova de Lisboa* .

Andrade, R., Leal, R., Roseiro, J., Reis, A., & Lopes da Silva, T. (2012). Monitoring *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921 batch fermentations growing under carbon and nitrogen limitation by flow cytometry. *World J Microbiol Biotechnol* , 1175-1184.

Bati, N., Hammond, E., & Glatz, B. (1984). Biomodification of fats and oils: trials with *Candida lipolytica*. *J. Am. Oil Chem. Soc.* , 61, 1743-1746.

Bhosale, P., & Gadre, R. (2001). Beta-carotene production in sugarcane molasses by a *Rhodotorula glutinis* mutant. *Journal Industrial Microbiological Biotechnology* , 327-332.

Bhosale, P., & Gadre, R. (2001). Optimization of carotenoid production from hyper-producing *Rhodotorula glutinis* mutant 32 by a factorial approach. *Lett. Applied Microbiology* , 12-16.

Bhosale, P., & Gadre, R. (2001). Production of beta-carotene by a Mutant of *Rhodotorula glutinis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* , 55, 423-427.

Bhosale, P., & Gadre, R. (2001). Production of beta-carotene by a *Rhodotorula glutinis* mutant in sea water medium. *Bioresource Technology* , 53-55.

Biofuels Platform. (n.d.). Retrieved Fevereiro 4, 2013, from <http://www.plateforme-biocarburants.ch/en/infos/eu-biodiesel.php>

Bouix, M., & Leveau, J.-Y. (2001). Rapid assessment of yeast viability and yeast vitality during alcoholic fermentation. *Journal of The Institute of Brewing* , 217-225.

Braunwald, T., Schwemmler, L., Graeff-Honninger, S., French, W., Hernandez, R., Holmes, W., et al. (2013). Effect of different C/N ratios on carotenoid and lipid production by *Rhodotorula glutinis*. *Applied Microbiological Biotechnology* .

Cheirsilp, B., Suwannarat, W., & Niyomdech, R. (2011). Mixed culture of oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* and microalgae *Chlorella vulgaris* for lipid production from industrial wastes and its use as biodiesel feedstock. *New Biotechnology* .

Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* , 294-306.

Choi, S., Ryu, D., & Rhee, J. (1982). Production of microbial lipid: effects of growth rate and oxygen on lipid synthesis and fatty acid composition of *Rhodotorula glutinis*. *Biotechnological Bioengineering* , 24, 1165-1172.

Cutzu, R., Clemente, A., Reis, A., Nobre, B., Mannazzu, I., Roseiro, J., et al. (2012). Assessment of beta-carotene content, cell physiology and morphology of the yellow yeast *Rhodotorula glutinis* mutant 400A15 using flow cytometry. *Industrial Microbiology and Biotechnology* .

Dai, C., Tao, J., Xie, F., Dai, Y., & Zhao, M. (2007). Biodiesel generation from oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* with xylose assimilating capacity. *African Journal of Biotechnology* , 2130-2134.

Desmond, A., & McCarthy, M. G. (2011). Cytometric analysis of cell phenotype and function . *Cambridge University Press* , 45-73.

Díaz, M., Herrero, M., García, L., & Quirós, C. (2010). Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses . *Biochemical Engineering Journal* , 385-407.

Easterling, E., French, W., Hernandez, R., & Licha, M. (2009). The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of *Rhodotorula glutinis*. *Bioresource Technology* , 356-361.

EIA, *Energy Information Administration. International Energy Statistics*. (n.d.). Retrieved Fevereiro 3, 2013, from http://www.eia.gov/forecasts/ieo/liquid_fuels.cfm

El Batal, H., Hasib, A., Ouattmane, A., Dehbi, F., Jaouad, A., & Boulli, A. (2011). Sugar composition and yield of syrup production from the pulp of Moroccan carob pods (*Ceratonia siliqua* L.). *Arabian Journal of Chemistry* .

El-Banna, A. A., El-Razek, A., & El-Mahdy, A. (2012). Some factors affecting the production of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis*. *Food and nutrition sciences* , 64-71.

Ercan, Y., Irfan, T., & Mustafa, K. (2013). Optimization of ethanol production from carob pod extract using immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells in a stirred tank bioreactor. *Bioresource Technology* , 365-371.

Farias, S., Lemões, J., Silva, P., & Silva, S. Correção do índice de iodo do óleo de tungue utilizando blendas com pinhão mando e mamona. *Simpósio estadual de agroenergia*.

Ferreira, S., Santos, W., Quintella, C., Neto, B., & Bosque-Sendra, J. (2004). Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry- review. *Talanta* , 1061-1067.

Freitas, C. (2011). Utilização da citometria de fluxo multiparamétrica na monitorização da resposta fisionológica da levedura *Saccharomyces carlsbergensis* em presença de ácido acético na produção de bioetanol. *Dissertação para obtenção do grau de mestre. Universidade Técnica de Lisboa* .

Freitas, C., Neves, E., Reis, A., Passarinho, P. C., & Lopes da Silva, T. (2012). Use of multi-parameter flow cytometry as tool to monitor the impact of formic acid on *Saccharomyces carlsbergensis* batch ethanol fermentations. *Applied Biochemistry and Biotechnology* , 2038-2048.

Freitas, C., Neves, E., Reis, A., Passarinho, P., & Lopes da Silva, T. (2012). Effect of Acetic Acid on *Saccharomyces Carlsbergensis* ATCC 6269 Batch Ethanol Production Monitored by flow cytometry. *Applied Biochemistry and Biotechnology* , 168.

Freitas, C., Nobre, B., Gouveia, L., Roseiro, J., Reis, A., & Lopes da Silva, T. (2013). New at-line flow cytometric protocols for determining carotenoid content and cell viability during *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921 batch growth.

Frengova, G. I., & Beshkova, D. M. (2009). Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance.

Galafassi, S., Cucchetti, D., Pizza, F., Franzosi, G., Bianchi, D., & Compagno, C. (2012). Lipid production for second generation biodiesel by the oleaginous yeast *Rhodotorula graminis*. *Bioresource Technology* , 398-403.

GBIF Taxonomy - Free and open access to biodiversity data. (n.d.). Retrieved Maio 16, 2013, from <http://www.gbif.org/species/2556470>

Heipieper, H., Weber, F., Sikkema, J., Keweloh, H., & De Bont, J. (1994). Mechanisms of resistance of whole cells to toxic organic solvents. *Trends Biotechnol.* , 12, 409-415.

Hu, C., Zhao, X., Zhao, J., Wu, S., & Zhao, Z. (2009). Effects of biomass hydrolysis by-products on oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Bioresource Technology* , 4843-4847.

Huang, C., Chen, X.-f., Xiong, L., Chen, X.-d., & Ma, L.-l. (2013). Single cell oil production from low-cost substrates: The possibility and potential of its industrialization. *Biotechnology advances* , 129-139.

ITIS- Standard report page. (n.d.). Retrieved Maio 16, 2013, from http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=194381

Karatay, S., & Dönmez, G. (2010). Improving the lipid accumulation properties of the yeast cells for biodiesel production using molasses. *Bioresource Technology* , 7988-7990.

Katsuragi, T., & Tani, Y. (2000). Screening for Microorganisms with specific characteristics by flow cytometry and single-cell sorting. *Journal of Bioscience and Bioengineering* , 217-222.

Kim, B. H., & Gadd, G. M. *Bacterial Physiology and Metabolism*. Korea: Cambridge University Press.

Koll, F., Sidoti, C., Rincheval, V., & Lecellier, G. (2001). Mitochondrial membrane potential and ageing in *Podospora anserina*. *Mechanisms of Ageing and Development* , 205-217.

Landolfo, S., Politi, H., Angelozzi, D., & Mannazzu, I. (2008). ROS accumulation and oxidative damage to cell structures in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains during fermentation of high-sugar-containing medium. *Biochimica et Biophysica Acta* , 892-898.

Latha, B., & Jeevaratnam, K. (2010). Purification and Characterization of the pigments from *Rhodotorula glutinis* DFR-PDY isolated from natural source. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry* , 166-174.

Lee, J. Y., Yoo, C., Jun, S., Ahn, C. Y., & Oh, H. M. (2010). Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresource Technology* , 75-77.

Lepage, G., & Roy, C. (1986). Direct transesterificação of all classes of lipids in a one-step reaction. *Journal of Lipid Research* , 27, 114-119.

Li, Y., Zhao, Z., & Bai, F. (2007). High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. *Enzyme and Microbial Technology* , 312-317.

Lima, M., Ortigueira, J., Alves, L., Paixão, S., & Moura, P. (2012). Evaluation of carob pulp as fermentation substrate for biohydrogen and organic acids production: sugars richness vs toxicity potential. *Environmental Engineering and Management Journal* , 11.

Lôbo, I., Ferreira, S., & Cruz, R. (2009). Biodiesel: Parâmetros de qualidade e métodos analíticos. *Química Nova* , 1596-1608.

Lopes da Silva, T., Feijão, D., & Reis, A. (2010). Using Multi-parameter flow cytometry to monitor the yeast *Rhodotorula glutinis* CCMI 145 batch growth and oil production towards biodiesel. *Appl Biochem Biotechnol* .

Lopes da Silva, T., Feijão, D., Roseiro, J., & Reis, A. (2011). Monitoring *Rhodotorula glutinis* CCMI 145 physiological response and oil production growing on xylose and glucose using multi-parameter flow cytometry. *Bioresource Technology* , 2998-3006.

Lopes da Silva, T., Reis, A., Hewitt, C., & Roseiro, J. C. (2004). Citometria de fluxo - Funcionalidade celular on-line em bioprocessos. *Boletim de Biotecnologia* , 32-40.

Lopes da Silva, T., Reis, A., Kent, C., Kosseva, M., Roseiro, J. C., & Hewitt, C. J. (2005). Stress-induced physiological responses to starvation periods as well as glucose and lactose pulses in *Bacillus licheniformis* CCMI 1034 continuous aerobic fermentation processes as measured by multi-parameter flow cytometry. *Biochemical Engineering* , 31-41.

Lopes da Silva, T., Roseiro, J. C., & Reis, A. (2012). Applications and perspectives of multi-parameter flow cytometry to microbial biofuels production processes. *Trends in Biotechnology* .

Marova, I., Certik, M., & Breierova, E. (2011). Production of Enriched Biomass by carotenogenic yeasts - Application of whole-cell yeast biomass to production of pigments and other lipid compounds . *Brno University of Technology, Faculty of Chemistry* .

Matsunaka, S., Morita, S., & Conti, S. (1966). Respiratory System of *Rhodotorula glutinis*- Inhibitor Tolerance and Cytochrome Components. *Plant Physiology* , 41, 1364-1369.

Meng, X., Yang, J., Xu, X., Zhang, L., Nie, Q., & Xian, M. (2009). Biodiesel production from oleaginous microorganisms . *Renewable Energy* , 1-5.

Naik, S. N., Goud, V. V., Rout, P. K., & Dalai, A. K. (2010). Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* , 578-597.

Nebe-von-Caron, G., Stephens, P., Hewitt, C., Powell, J., & Badley, R. (2000). Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting. *Journal of Microbiological Methods* , 97-114.

Nie, Z.-K., Deng, Z.-T., Zhang, A.-H., Ji, X.-J., & Huang, H. (2013). Efficient arachidonic acid-rich oil production by *Mortierella alpina* through a three-stage fermentation strategy.

Oliveira, O. (2009). Optimização da produtividade lipídica da microalga *Arthrospira platensis* como matéria-prima para biocombustíveis. *Dissertação para obtenção do grau de mestre em Bioenergia. Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa* .

Omer, A. M. (2008). Energy, environment and sustainable development. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* , 2265-2300.

Pasten, C., & Santamarina, J. (2012). Energy and quality of life. *Energy Policy* , 468-476.

Perrier, V., Dubreucq, E., & Galzy, P. (1995). Fatty acid and carotenoid composition of *Rhodotorula* strains. *Arch. Microbiol.* , 164, 173-179.

Petit, M., & Pinilla, J. (1995). Production and purification of a sugar syrup from Carob Pods. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* , 145-152.

Portal Energia- *Energias Renováveis*. (n.d.). Retrieved Outubro 8, 2013, from <http://www.portal-energia.com/os-biocombustiveis-em-portugal/>

Poulsen, A., Andersen, A., Brasen, J., Scharff-Poulsen, A., & Olsen, L. (2008). Probing glycolytic and membrane potential oscillation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* , 47, 7477-7484.

Raschke, D., & Knorr, D. (2009). Rapid monitoring of cell size, vitality and lipid droplet development in the oleaginous yeast *Waltomyces lipofer*. *Journal of Microbiological Methods* , 178-183.

Roseiro, J. C. (1991). Improvement of xanthan fermentation technology using carob-based feeds.

Roseiro, L., Duarte, L., Oliveira, D., & Gírio, F. (2013). Supercritical, ultrasound and convencional extracts from carob (*Ceratonia siliqua* L.) biomass: Effect on the phenolic profile and antiproliferative activity. *Industrial Crops and Products* , 132-138.

Roukas, T. (1996). Ethanol production from non-sterilized beet molasses by free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells using fed-batch culture. *Journal of food engineering* , 87-96.

Rubio, M., Runco, R., & Navarro, A. (2002). Invertase from a strain of *Rhodotorula glutinis*. *Phytochemistry* , 61, 605-609.

Sabnis, R., Deligeorgiev, T., Jachk, M., & Dalvi, T. (1998). DiOC6(3): a useful dye for staining the endoplasmic reticulum. *Biotechnical and Histochemistry* , 84, 1385-1390.

Saenge, C., Cheirsilp, B., Suksaroge, T. T., & Bourtoom, T. (2011). Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. *Process Biochemistry* , 210-218.

Sánchez, S., Lozano, L., Godínez, C., Juan, D., Pérez, A., & Hernández, F. (2010). Carob pod as a feedstock for the production of bioethanol in Mediterranean areas. *Applied Energy* , 3417-3424.

Schneider, T., Graeff-Hönniger, S., French, W., Hernandez, R., Merkt, N., Claupein, W., et al. (2013). Lipid and carotenoid production by oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* cultivated on brewery effluents. *Energy* , 1-10.

Stansell, G., Gray, V., & Sym, S. (2012). Microalgal fatty acid composition: implications for biodiesel quality. *Journal Applied Phycology* , 24, 791-801.

Takara, K., Ushijima, K., Koji, W., Iwasaki, H., & Yamashita, M. (2007). Phenolic Compounds from sugarcane molasses possessing antibacterial activity against cariogenic bacteria. *Journal of Oleo Science* , 611-614.

Takeshige, K., & Ouchi, K. (1995). Factors affecting the ethanol productivity of yeast in molasses. 79.

Talebnia, F., Karakashev, D., & Angelidaki, I. (2010). Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresource Technology* , 4744-4753.

Turhan, I., Bialka, K., Demirci, A., & Karhan, M. (2010). Ethanol production from carob extract by using *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology* , 5290-5296.

V.W., J., M., S., V., S., D., A., V., S., & N., Y. (1995). Utilization of molasses for the production of fat by an oleaginous yeast, *Rhodotorula glutinis* IIP-30. *Journal Industrial Microbiol.* , 14, 1-4.

Valduga, E., Valério, A., Treichel, H., Di Luccio, M., Jacques, R., & Júnior, A. (2007). Pré-tratamentos de melaço de cana-de-açúcar e água de maceração de milho para a bioprodução de carotenóides. *Química Nova* , 1860-1866.

Vicente, G., Bautista, F., Rodriguez, R., Garre, V., Gutiérrez, F., Sábada, I., et al. (2009). Biodiesel production from biomass of an oleaginous fungus.

Xu, J., Zhao, X., Wang, W., Du, W., & Liu, D. (2012). Microbial conversion of biodiesel byproduct glycerol to triacylglycerols by oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* and the individual effect of some impurities on lipid production. *Biochemical Engineering Journal* , 30-36.

Yen, H., & Zhang, Z. (2011). Effects of dissolved oxygen level on cell growth and total lipid accumulation in the cultivation of *Rhodotorula glutinis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* , 71-74.

Yen, H., & Zhang, Z. (2011). Enhancement of cell growth rate by light irradiation in the cultivation of *Rhodotorula glutinis*. *Bioresource Technology* , 9279-9281.

Yoon, S., & Rhee, J. (1983). Lipid from yeast fermentation: effects of cultural conditions on lipid production and its characteristics of *Rhodotorula glutinis*. *J Am Oil Chem Soc* , 1281-1286.

Zeng, X., Danquah, M., Chen, X., & Lu, Y. (2011). Microalgae bioengineering: from CO₂ fixation to biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* , 3252-3260.

Zhang, G., French, W., Hernandez, R., & Alley, E. (2011). Effects of furfural and acetic acid on growth and lipid production from glucose and xylose by *Rhodotorula glutinis*. *Biomass and bioenergy* , 734-740.

Anexo I. Reagentes

Tabela 12- Reagentes químicos utilizados ao longo do trabalho laboratorial. CF- citometria de fluxo; EC- Extração de carotenóides; EFCS- Ensaio fontes de carbono simples; MCSD- Meio de cultura semi-definido; RT- Reação de transmetilação; MR- Meio de replicagem.

Nome	MM (g·mol ⁻¹)	Fórmula	Pureza	Marca	Utilização
Acetona	58,08	CH ₃ COCH ₃	99,5 %	Merck	EC
Ácido Clorídrico fumante	36,45	HCl	37,0 %	Merck	MCC
Cianina carbonil m- clorofenilhidrazona	204,62	C ₉ H ₅ CIN ₄	-	Sigma	CF
Cloreto de Acetilo	78,50	C ₂ H ₃ ClO	98,5 %	Panreac	RT
Cloreto de Cálcio dihidratado	147,02	CaCl ₂ •2 H ₂ O	99,5 %	Merck	MCC
Diacetato de carboxifluoresceína (DiOC ₆ (3))	532,459	C ₂₈ H ₂₀ O ₁₁	-	Invitrogen	CF
Di-hidrogenofosfato de Potássio	136,09	KH ₂ PO ₄	99,0 %	Panreac	MCC
Dimetilsulfóxido	78.13	C ₂ H ₆ OS	-	Riedel-de Haiën	EC
Éter de Petróleo (40°C-60°C)	-	(CH ₃) ₃ COCH ₃	-	Fisher Chemical	EC
Extrato de levedura	-	-	-	BD	MCC
Frutose	180,16	C ₆ H ₁₂ O ₆	99,0%	Sigma	EFCS
Glicerol	92,078	C ₃ H ₈ O ₃	99,5%	Sigma	EFCS
Glucose Monohidratada	198,17	C ₆ H ₁₂ O ₆ •H ₂ O	-	Merck	MCC, EFCS
Hidrogenofosfato de di-sódio anidro	141,96	Na ₂ HPO ₄	99,0 %	Panreac	MCC
Hidróxido de sódio	39,99	NaOH	-	-	MCC
Iodeto de 3,3'- dihexiloxacarbocianina	572,23	C ₂₉ H ₃₇ I ₂ N ₂ O ₂	-	Invitrogen	CF
Iodeto de propídio	668,4	C ₂₇ H ₃₄ I ₂ N ₄	-	Invitrogen	CF

Malt Extract Agar Base	-	-	-	Himedia	MR
Metanol	32,04	CH ₃ OH	99,8 %	Merck	RT
n-heptano	100,21	C ₇ H ₁₆	99,0 %	Merck	RT
Sacarose	342,30	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		Merck	EFCS
Sulfato de Magnésio Heptahidratado	246,48	MgSO ₄ •7 H ₂ O	99,5 %	Merck	MCC
Sulfato de Sódio anidro	142,04	Na ₂ SO ₄	99,0 %	Merck	EC; RT
Ureia	60,06	CH ₄ N ₂ O	99,5 %	Harnstoff	MCC

Anexo II. Correlação entre a absorvância e a massa seca da biomassa

Foi feita a correlação entre a massa seca da biomassa e a absorvância a 600 nm para mais facilmente se obter a concentração de biomassa ao longo do tempo, nas culturas de *R. glutinis*.

A equação obtida é: Absorvância 600 nm = 0,7062 [biomassa]+0,4338. O coeficiente de correlação R^2 foi de 0,9986.

